

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Abt. für Experimentelle Virologie

Die Vermehrung von Herpesviren der Typen 1 und 2
in Makrophagen und die Pathogenese der intra-
peritonealen Herpesinfektion in MMRI- und C57-bl-6-Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Medizinischen Fachbereich vorgelegt

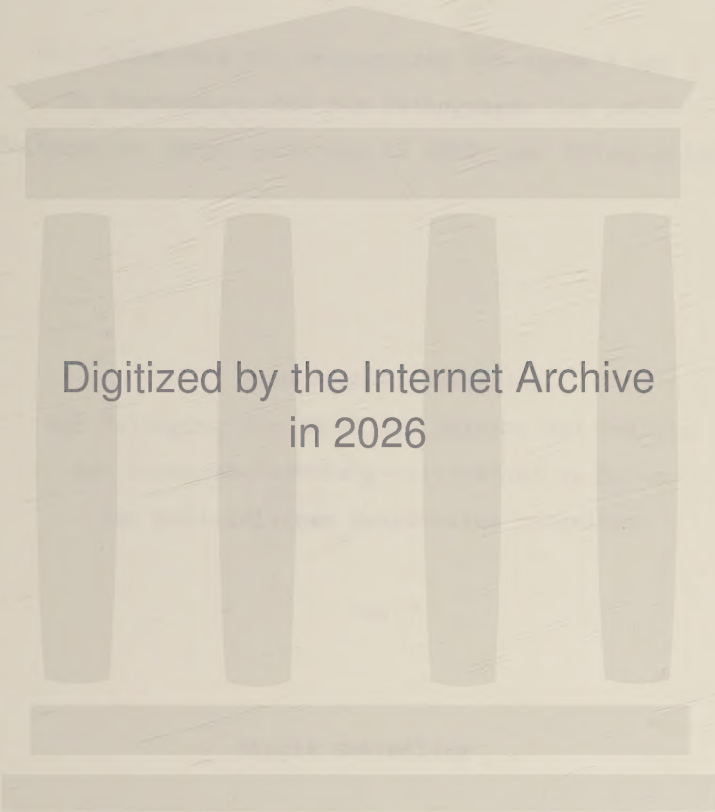
VON

Birgit Schindling

aus

Hattersheim

Mainz 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Abt. für Experimentelle Virologie

Die Vermehrung von Herpesviren der Typen 1 und 2
in Makrophagen und die Pathogenese der intra-
peritonealen Herpesinfektion in NMRI- und C57-bl-6-Mäusen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
dem Medizinischen Fachbereich vorgelegt

von

Birgit Schindling

aus

Hattersheim

Mainz 1979



Dekan : Prof. Dr. H. Leithoff

1. Gutachter : Prof. Dr. D. Falke

2. Gutachter : Prof. Dr. M. Loos

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 7. 1979

Die Vermehrung von Herpesviren der Typen 1 und 2
in Makrophagen und die Pathogenese der intra-
peritonealen Herpesinfektion in NMRI- und C57-bl-6-Mäusen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5.
1.1.	Die Makrophagen	1
1.1.1.	Herkunft und Funktion	1
1.1.2.	Stimulierte Makrophagen - Allgemeines	4
1.1.3.	Stimulation von Makrophagen mit Thioglycollat-Medium (TM)	7
1.2.	Die experimentelle Herpesinfektion	12
1.2.1.	Die Rolle der Makrophagen	12
1.2.2.	Hvh-1 und Hvh-2 - Typenunterschiede	22
1.3.	Die Rolle der Makrophagen bei anderen Virusinfektionen	26
1.4.	Die genetische Resistenz gegenüber Virusinfektionen - wichtige Modelle	30
1.5.	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	38
2.	Materialien und Methoden	39
2.1.	Medien	39
2.2.	Zellen	41
2.2.1.	Makrophagen	41
2.2.2.	Embryonale Mäusefibroblasten	42
2.2.3.	Kaninchennierenzellen	42
2.3.	Thioglycollatmedium (TM)	43
2.4.	Viren	44
2.5.	Mäuse	45
2.6.	Organentnahmen	45
2.7.	Bestimmung der Infektiosität	46
2.7.1.	Bestimmung des Virusgehalts im Überstand der Makrophagen- und Fibroblastenkulturen	46
2.7.2.	Organtitrationen	46
2.8.	Berechnung der Mittelwertreihen für die Makrophagen- und Fibroblastenversuche	47
3.	Ergebnisse	49
3.1.	In-vitro-Untersuchungen: Das Vermehrungsverhalten der Herpesviren in Makrophagen- und Fibroblastenkulturen	49

3.1.1.	Die thermische Inaktivierung von Herpesviren während 72-stündiger Inkubation bei 37°C	49
3.1.2.	Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagen	52
3.1.3.	Die Vermehrung der Herpesviren in embryonalen Fibroblastenkulturen von NMRI- und C57-bl-6-Mäusen	65
3.2.	In-vivo-Untersuchungen	70
3.2.1.	Das klinische Erscheinungsbild bei der intra-peritonealen Infektion mit den Hvh-Stämmen Len (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2)	70
3.2.2.	Untersuchungen zum Einfluß des TM auf die Pathogenese der i.p. Herpesinfektion	71
3.2.2.1.	Applizierte Virusdosen	71
3.2.2.2.	Zeitkinetik für TM	72
3.2.2.3.	Dosis-Wirkungsbeziehung für TM bei einer Infektion mit dem Stamm Len (Hvh-1)	75
3.2.2.4.	Der Einfluß von TM 72 h a.i. und 3 h a.i. auf die Infektion mit Len (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2)	77
3.2.2.5.	Der Einfluß des TM auf die i.p.-Infektion mit anderen Stämmen des Hvh	81
3.2.2.6.	Die Wirkung des TM auf den Virusgehalt in den Organen	83
3.2.3.	Die unterschiedliche Empfänglichkeit der NMRI- und C57-Mäuse gegenüber der Infektion mit Herpesviren	92
3.2.3.1.	Intraperitoneale Inokulation	92
3.2.3.2.	Intracerebrale Inokulation	94
3.2.3.3.	Der Virusgehalt in den Organen der NMRI- und C57-Mäuse nach intraperitonealer Infektion	96
3.2.4.	Anhang: Positive Virusbefunde im Thymus	102
4.	Diskussion	104
4.1.	Die Vermehrung von Herpesviren in den Makrophagen und Fibroblasten der NMRI- und C57-Mäuse in vitro	104
4.2.	Der Einfluß von Thioglycollat-Medium auf die i.p. Infektion mit Hvh-1 und Hvh-2 in der erwachsenen Maus	115

4.3.	Die unterschiedliche Resistenz der NMRI- und C57-bl-Mäuse gegenüber der Infektion mit Hvh-1 und Hvh-2	144
4.4.	Die Rolle weiterer Abwehrmechanismen bei der Pathogenese der Herpesinfektion	160
5.	Zusammenfassung	164
6.	Tabellarischer Anhang	167
7.	Verzeichnis der zitierten Quellen	205
8.	Lebenslauf	233

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
a.i.	ante infectionem
AK	Antikörper
ALS	Antilymphozytenserum
AMS	Antimakrophagenserum
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BHK-Zellen	baby-hamster-kidney-Zellen
Co, Ko	Viruskontrollgruppe
CPE	cytopathischer Effekt
d	Tag(e)
DS 500	Dextransulfat 500
h	Stunde(n)
HSV	Herpes simplex virus
Hvh	Herpesvirus hominis
i.c.	intracerebral
ID 50	Virusdosis, bei der 50 % der Tiere erkranken
IE	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LCM(V)	(Virus der) lymphozytäre(n) Choriomeningitis
LD 50	Virusdosis, bei der 50 % der Tiere sterben
Len	Hvh-1-Stamm Lennette
MCMV, MCMV	Mäusecytomegalievirus
MHV	Mäusehepatitisvirus
min	Minute
Morb.	Morbidität

Mort.	Mortalität
n	Zahl der Versuche, Zahl der Tiere
n.d.	not done
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PEC	Zellen im Peritonealexsudat
pfu	plaque forming units
p.i.	post infectionem
PPD	tuberculin purified protein derivative
rel.	relativ
RES	Retikuloendotheliales System
RM	Rückenmark
s	Standardabweichung
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TM	Thioglycollat-Medium
Upm	Umdrehung pro Minute
Vs.Nr.	Versuch Nummer
VSV	Vesicularstomatitisvirus
WNV	Westnilvirus
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Makrophagen

1.1.1. Herkunft und Funktion

Monozytäre Zellen sind die wichtigsten Elemente des retikulohistiozytären Systems. Sie sind nahezu in allen Kompartimenten des Organismus vertreten, im Blut als Monozyten, in den parenchymatösen Organen, vor allem in der Leber (von Kupffersche Sternzellen), in der Milz und den Lymphknoten, als Gewebsmakrophagen und als freie Makrophagen vor allem in den Alveolarsepten und in der Bauchhöhle. Sie sind beteiligt an der Aufnahme und Abwehr infektiöser Agentien, an Entzündungsprozessen, an Abbau und Reparatation untergegangenen Gewebes, an der Resorption nicht mehr funktionstüchtiger Erythrozyten und am Fettstoffwechsel (21, 45, 97 150).

Mims (98) konnte die Aufnahme und Zerstörung von Viruspartikeln aus dem Blut durch die von Kupfferschen Sternzellen nachweisen und prägte für diesen Vorgang den Begriff der "Virusclearance". Diese Eigenschaft der Makrophagen führt dazu, daß das empfindliche Leberparenchym bei einer Virämie vor dem Eindringen der Viruspartikel geschützt ist. Applizierte er hingegen das Virus direkt durch den Gallengang unter Umgehung auch der in den Sinus gelegenen Monozyten, kam es zu einer schweren Hepatitis mit anschließendem Tod der Tiere.

Prinzipiell sind vier verschiedene Formen einer Interaktion zwischen Viren und Makrophagen möglich, nämlich erstens keine Aufnahme des Virus durch die Makrophagen, zweitens Aufnahme und Zerstörung des Virus durch die Makrophagen, drittens Aufnahme des Virus und passiver Transfer innerhalb der

Makrophagen in susceptible Gewebe und viertens Aufnahme und Multiplikation des Virus in den Makrophagen. (97, 52)

In unserem experimentellen Modell werden wir uns nahezu ausschließlich mit den Peritonealmakrophagen beschäftigen.

Zahlreiche Arbeiten auf der Basis radioaktiver Markierungsstudien haben ergeben, daß die Peritonealmakrophagen von sehr teilungsaktiven Precursorzellen im Knochenmark abstammen (50, 167, 170, 171, 172, 201). Die Nachkommen dieser Zellen gelangen als Monozyten, zu einem geringeren Teil aber auch als morphologisch den kleinen Lymphozyten ähnliche Zellen (171) ins Blut, wo sie sich ungefähr eine Woche lang aufhalten, um dann als Makrophagen in andere Kompartimente des Körpers auszuwandern. Ein kleinerer Teil der freien Makrophagen hat seinen Ursprung vielleicht auch in den sinusoidalen Histiozyten in Leber und Milz. (171, 151, 195). Dagegen erscheint die hauptsächlich von Rebuck und Vernon-Roberts vertretene Theorie (29, 130, 131, 168, 195) einer Abstammung der Makrophagen von den kleinen Lymphozyten aus dem lymphatischen Gewebe unter der Anwesenheit von Neutrophilen nach den Ergebnissen von Volkman & Gowans (170 - 172) und Goodman (50) zumindest in quantitativer Hinsicht unwahrscheinlich. Auch die sogenannte "milky spots" im Omentum als mögliche Quelle der Makrophagen wurde diskutiert (29, 172), ihnen kommt aber nach den oben genannten Untersuchungen ebenfalls keine Bedeutung zu.

Unter normalen Bedingungen sind nur die Precursorzellen im Knochenmark teilungsfähig, während bei den anderen Vertretern der monozytären Reihe die Synthese der Zell-DNA supprimiert ist. (20)

Die verschiedenen monozytären Formen unterscheiden sich in ihrem Differenzierungsgrad, der sich in ihrer Morphologie und in ihrem Enzymmuster widerspiegelt: Die Makrophagen in der Bauchhöhle normaler, nicht vorbehandelter Mäuse sind noch recht monozytenähnlich. Längere in-vitro-Kultivierung führt parallel mit einer Ausbreitung der Zellen auf der Oberfläche des Kulturgefäßes und der Bildung von Pseudopodien zu einem Anstieg des Gehaltes an phasendichten Granula, die sekundäre Lysosomen darstellen und daher als Maß für die Endozytoseaktivität der Zelle angesehen werden können. Auch der Enzymgehalt der Zelle steigt an. Die Zelle selbst wird größer. (20, 22)

Diese Veränderungen gleichen denen bei vorausgehender in-vivo-Aktivierung (siehe Kap. 1.1.2. und 1.1.3.) und könnten der Reifung der Zellen in vivo innerhalb eines entzündlichen Prozesses entsprechen (20, 22). Insgesamt ist das Erscheinungsbild der monozytären Zellen nicht statisch, sondern stellt eine permanente Anpassung an die Einflüsse der Umgebung dar (20).

Im Energiestoffwechsel erfolgt mit zunehmender Zelldifferenzierung eine Umstellung von der anaeroben Glykolyse zur oxydativen Phosphorylierung.

Die Makrophagen zeichnen sich - im Gegensatz zu den polymorphkernigen Leukozyten - durch eine rege Synthese von Makromolekülen aus (20, 6). Unter den zahlreichen Proteinen, die gebildet werden, seien die endogenen Pyrogene, einige Serumproteine (z.B. Beta-1-c-Protein, Transferrin) und vor allem Interferone von variierendem Molekulargewicht (34 000 - 213 400) genannt (20).

1.1.2. Stimulierte Makrophagen - Allgemeines

Über die Termini "stimulierte" bzw. "aktivierte" Makrophagen, die im Folgenden als Synonyma gebraucht werden sollen, herrscht in der Literatur einige Unklarheit. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten der Stimulation, nämlich erstens die Stimulation von Makrophagen im Verlauf einer Infektion mit einem intrazellulären Parasiten (z.B. Mycobacterium bovis, Listerien). Hierbei versetzen immunologisch kompetente Lymphozyten die Makrophagen über Freisetzung einer Reihe von Mediatoren in einen aktivierten Zustand (157). Diese Stimulation ist also insofern spezifisch induziert, als die immunologisch geprägten Lymphozyten mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt kommen müssen, um die Faktoren freisetzen zu können (94, 95, 113). Der Effekt der Makrophagenstimulation richtet sich aber nicht nur gegen das spezifische Agens, sondern gegen alle möglichen in den Organismus eindringenden Agentien, ist also in seinem Wirkungsspektrum unspezifisch (157). So sind zum Beispiel BCG-immunisierte Mäuse über einen bestimmten Zeitraum hinweg resistent gegenüber Listerieninfektionen (95).

Es ist aber zweitens auch möglich, eine Population von stimulierten Makrophagen zu erhalten, indem man in das Peritoneum Substanzen appliziert, die dort unspezifisch eine Entzündung induzieren; einige davon sind Stärkegele, Endotoxin, Proteose-Pepton, Casein, fetales Kälberserum oder Thioglycolat - Medium (TM) (31, 62, 74, 155, 167). Obwohl bekannt ist, daß die durch die jeweilige Substanz hervorgerufenen Veränderungen an den Zellen von unterschiedlicher Intensität sind,

besteht noch keine Klarheit darüber, ob sich die erzeugten entzündlichen Exsudate auch hinsichtlich ihrer qualitativen Zusammensetzung unterscheiden. Karnovsky et al. und Edelson & Zwiebel (74, 31) vertreten die Ansicht, daß die Population der stimulierten Makrophagen - unabhängig von der Art des stimulierenden Agens - zusammengesetzt ist aus den auch normalerweise im Peritoneum vorhandenen, also "residenten" Zellen und solchen Zellen, die durch den Entzündungsreiz in das Peritoneum gelangen. Diese Theorie wird belegt durch Befunde von van Furth & Cohn (167), die durch radioaktive Markierung von Monozyten und anschließende Stimulation der Peritonealmakrophagen mit fetalem Kälberserum erstens einen Anstieg der Zahl der Blutmonozyten und zweitens einen Anstieg der Zahl markierter Peritonealmakrophagen nachweisen konnten. Dagegen fanden sie keinen signifikanten Anstieg der markierten Makrophagen, wenn sie Peritonealzellen 48 h nach der Injektion von fetalem Kälberserum kultivierten und mit 3H-Thymidin inkubierten. Demnach ist der Anstieg der Zahl der Peritonealmakrophagen nach der Injektion eines stimulierenden Agens nicht durch eine Teilung der in der Peritonealhöhle residenten Zellen, sondern durch die Herbeischaffung neuer Makrophagen aus dem Knochenmark über den Blutweg zu erklären.

Allen aktivierten Makrophagen ist gemeinsam, daß sie sich von den unstimulierten hinsichtlich ihrer Zellgröße (74), ihrer Fähigkeit, Partikel zu phagozytieren und Mikroorganismen abzutöten (74, 95, 167), ihrer Ausbreitungstendenz auf Glasflächen (62), ihrer Stoffwechselrate (62) und ihres Enzymgehalts unterscheiden. Die gesteigerte Funktion spiegelt sich morphologisch in einem höheren Gehalt an Mitochondrien und

lysosomalen Vakuolen wieder (14, 64). Ebenso wie die Promonozyten haben die stimulierten Makrophagen wieder einen gut entwickelten Golgiapparat und sehr viele Polyribosomen im peripheren Zytoplasma, was als strukturelles Korrelat einer gesteigerten Proteinsynthese und einer erhöhten Rate des intrazellulären Transports gedeutet werden kann (62).

1.1.3. Stimulation von Makrophagen mit Thioglycollat-Medium (TM)

Die Stimulation mit Thioglycollat-Medium (TM) führt zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Peritonealexsudates, auf die wir im Folgenden zunächst eingehen wollen.

Die Angaben über den Anteil der adhärierenden Zellen in der Bauchhöhle nicht vorbehandelter Mäuse sind schwankend. Stewart et al. (155) fanden 15 % adhärierende Zellen, von denen wiederum nur 22 % Hefe phagozytierten, der Rest setzte sich zusammen aus nicht phagozytierenden Mononucleären, Fibroblasten und B-Lymphozyten, die eine gewisse Neigung zur Adhärenz zeigten. Andere Autoren (47, 163) geben einen Anteil von 30-40 % bzw. 35 - 50 % Makrophagen an. Die nicht-adhärierenden Zellen sind in der Hauptsache Lymphozyten. Insgesamt enthält das Peritonealexsudat von unstimulierten Mäusen circa 5×10^6 Zellen. (181)

Die Injektion von Thioglycollat-Medium erzeugt eine entzündliche Reaktion, in deren Gefolge die Zahl der Zellen im Peritonealexsudat auf $1,5-2,0 \times 10^7$ erheblich ansteigt (7). Am ersten Tag wird das Bild von einer Infiltration durch polymorphkernige Leukozyten bestimmt, die zu diesem Zeitpunkt ungefähr 60-70 % der Gesamtzellen ausmachen, aber bis zum dritten Tag wieder nahezu vollständig verschwunden sind (31, 155). Nach Stewart et al. (155) liegt das Maximum der absoluten Zellzahl am ersten und zweiten Tag nach der TM-Injektion, während das Maximum der adhärierenden Zellen am zweiten bis dritten Tag liegt; Edelson & Zwiebel haben das Maximum der Makrophagenzahl erst am vierten Tag beobachtet (31).

Wachsmuth (173) beschreibt das Maximum der absoluten Zellzahl ebenfalls am zweiten Tag, die Zahl der Mononucleären steigt bei ihm sogar bis zum fünften Tag an, während die Aktivität des Leitenzyms der Makrophagen pro Zelle noch bis zum siebten Tag hin anwächst. Er schließt hieraus auf einen langsamen Differenzierungsmechanismus in den stimulierten Zellen, der bis zum siebten Tag dauert. TM erhöht den Anteil der Makrophagen im Peritonealexsudat bis auf 70-80 % (47, 163) am dritten Tag bei einer absoluten Zellzahl von 4×10^7 pro Bauchhöhle. Somit wird also nicht nur die absolute Zahl der PEC, sondern auch der relative Anteil der Makrophagen deutlich erhöht.

Durch TM-Stimulation gelangen jedoch auch zelluläre Elemente ins Peritoneum, die sich grundsätzlich von den dort residenten unterscheiden: Durch Kultivierung TM-induzierter Makrophagen in einem Medium, das L-Fibroblasten-Überstand, Pferde- und inaktiviertes Kälberserum enthielt, gelang es Stewart et al., Makrophagen über 18 Tage hinweg zur Vermehrung zu bringen, mit einer Verdopplungszeit von 18 Stunden (155). Zu geringer Zelldichte ausgesät, bildeten die Zellen Kolonien, die jeweils von einer einzelnen Precursorzelle abstammten. In der nicht stimulierten Peritonealhöhle kommen solche Precursorzellen nur ganz selten vor. Ihre Zahl steigt jedoch bereits 4 Stunden nach TM-Injektion an und erreicht ihr Maximum am dritten Tag, wonach sie wieder abfällt. Während die Gesamtzahl der PEC nur um das maximal Zehnfache ansteigt, erreicht die Anzahl der koloniebildenden Precursorzellen ein Viel-Tausendfaches (83). Bis zu einer Dosierung von 1,6 ml TM pro Maus ist dieser Effekt dosisabhängig (93). Anstelle des Wachstumsfaktors im L-Fibroblastenüberstand machte auch der

Überstand von vier Tage lang kultivierten Makrophagen die Precursorzellen aktionsfähig (155). Auch mit Hilfe eines löslichen Faktors aus Lymphknoten-Lymphozyten, der mit großer Wahrscheinlichkeit wiederum auf die Precursorzellen wirkt, konnte man Makrophagen in vitro teilungsfähig machen (56).

Die TM-aktivierten Makrophagen unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer morphologischen Struktur von den normalen Zellen. Ihre Größe übersteigt die der unstimulierten Peritonealmakrophagen um das Drei- bis Zehnfache (31, 62). Die Membranaktivität ist erhöht: Sie adhärieren besser und breiten sich schneller auf Glasflächen aus (163). Während normale Makrophagen für einige Stunden nach ihrer Kultivierung abgerundet bleiben, sind die TM-stimulierten bereits nach 30 Minuten ausgebreitet (122). Ihre Oberfläche zeigt stärker gekräuselte Membranen. Bereits nach zweistündiger Kultivierung bilden sich lange, strangförmige zytoplasmatische Ausziehungen. Die Anzahl der interzellulären Kontakte über die Filopodien ist erhöht (122). Das Zytoplasma ist stärker granuliert. Polliack (122) beschreibt zahlreiche perinucleäre Vakuolen als Ausdruck der erhöhten Phagozytoseaktivität, wie sie von zahlreichen Autoren für verschiedene Partikel nachgewiesen wurde (148, 122). TM-aktivierte Makrophagen zeigen auch kleine zytoplasmatische Grübchen und Perforationen, die wahrscheinlich Pinozytosevesikel darstellen; demgemäß beobachtet man eine 4- bis 10-fach erhöhte Pinozytoseaktivität für verschiedene Peroxidasen (31, 122). Durch Hinzufügung von Concanavalin A kann das Pinozytosepotential noch weiter gesteigert werden (31).

Im Vergleich zu den Veränderungen, die andere unspezifisch stimulierende Agentien, wie beispielsweise das Endoto-

xin, hervorrufen, scheint TM von sehr starker Wirkung zu sein (122, 31). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich in einem additiven Effekt der Teilkomponenten des Mediums zu suchen, da deren einzelne Zufuhr zu geringergradigen Veränderungen führt (31). Im Zytoplasma der TM-stimulierten Zellen finden sich bündelweise gruppierte Filamente und riesige, unregelmäßig geformte Vakuolen. Solche Strukturen fehlen in Makrophagen, die mit anderen Substanzen aktiviert worden sind. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Inhalt der Vakuolen um Agar, der nicht verdaut werden kann (47, 62).

Die erhöhte Stoffwechselaktivität der TM-stimulierten Makrophagen hat ihr Korrelat in einer gesteigerten Aktivität der zellulären Enzyme. Wachsmuth (173) berichtet, daß der Gehalt der plasmagebundenen Amino-peptidase auf das 30-fache angestiegen ist, was bei einer Verdreifachung der Zellgröße gegenüber den normalen Makrophagen noch einer 10- bis 20-fachen Erhöhung der Enzymkonzentration pro Flächeneinheit entspricht. Der Autor hält den starken Aktivitätszuwachs gerade dieses Enzyms für eine spezifische Antwort der Zelle auf das TM, das sehr viele Peptide enthält. Es wird auch eine intrazelluläre Protease, die in den normalen Makrophagen nicht vorhanden ist, der "Plasminogenaktivator", produziert und sezerniert (163). Strauss (156) beschreibt neben einer erhöhten Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase auch einen Anstieg im Peroxidase-Gehalt. Dies steht im Widerspruch zu den Befunden von Hirsch & Fedorko (62), wonach der Peroxidase-Gehalt vom Promonozyten über den Monozyten zum normalen und stimulierten Makrophagen hin ständig abnimmt.

Auch in immunologischer Hinsicht bestehen Unterschiede

zwischen normalen und TM-stimulierten Makrophagen. Bianco (14) fand qualitative Unterschiede in der Funktion der Complement-rezeptoren. Lutton & Kiremidjian (93) untersuchten die Mobilität von normalen und stimulierten Makrophagen in der Zell-Elektrophorese. Sie fanden, daß stimulierte Zellen langsamer wandern als normale und daß die Anwesenheit von aggregiertem Kaninchen-Gamma-Globulin zwar die Mobilität der normalen Makrophagen um 33 % reduzierte, die Mobilität der TM-aktivierten Makrophagen jedoch nicht beeinflusste. Die Autoren schlossen hieraus, daß sich beide Zellarten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Kaninchen-Gamma-Globulin zu binden, unterscheiden. Unkeless & Eisen (181) fanden dagegen keine Unterschiede in den Bindungsaffinitäten gegenüber Immunglobulinen, obwohl die TM-stimulierten Makrophagen vier mal so viele Bindungsstellen besaßen.

1.2. Die experimentelle Herpesinfektion

1.2.1. Die Rolle der Makrophagen

Bereits seit den Untersuchungen von Black und Melnick (15) aus dem Jahr 1955, in denen sie zeigten, daß sich Herpesviren auch in der Anwesenheit von hohen Konzentrationen neutralisierender Antikörper vermehren und die Infektion in einem Zell-Monolayer weitergeben, war es einleuchtend, daß die humorale Immunität im Körper nicht der einzige Mechanismus sein kann, mit dessen Hilfe die Ausbreitung dieser Viren im Organismus gestoppt wird. Sie mußten sich also in einer Weise ausbreiten können, die dem Zugriff der humoralen Antikörper weitgehend entzogen ist. Es ist außerdem bekannt, daß Herpesviren an der Oberfläche der von ihnen infizierten Zellen die Bildung von virusspezifischen Antigenen induzieren (17, 66). Da antivirale Antikörper plus Complement in vitro zwar die herpesinfizierten Zellen zerstören, die Virusausbreitung aber nicht verhindern können (114, 115), muß hieraus auf einen Ausbreitungsmodus direkt von Zelle zu Zelle ohne Exposition zu den außerhalb der Zelle gelegenen Antikörpern - wahrscheinlich über Interzellularbrücken - geschlossen werden (6, 35, 36, 37, 88), der offensichtlich bereits stattgefunden hat, wenn die Zelle aufgrund ihrer neuen Antigenität als fremd erkannt und zerstört wird.

Lodmell et al. (88) gelang es, die Virusausbreitung auf infizierten Monolayern von Kaninchennieren zu stoppen, indem sie diese mit Peritonealzellen von Kaninchen inkubierten, die 72 h vorher intraperitoneal (i.p.) mit Casein vorbehandelt worden waren. Die Aktivierung der Makrophagen erwies sich als

notwendig, da Peritonealzellen nicht vorbehandelter Tiere die Bildung der viralen Plaques nur in wesentlich geringerem Ausmaß verhindern konnten. Wurden die Makrophagen jedoch wieder von den Monolayern entfernt, entwickelten sich auch die Plaques wieder. In kombinierter Gabe mit Antikörpern und Complement führten sie dagegen zum endgültigen Verschwinden der cytopathischen Effekte. Die Autoren schlossen daraus, daß die Antwort eines Organismus auf die Herpesinfektion aus zwei Phasen bestehen muß, nämlich erstens der spezifischen Phase, in der antivirale Antikörper, das Complementsystem und sensibilisierte Lymphozyten in Aktion treten und Mediatoren freisetzen, die entweder direkt die Virusmultiplikation unterdrücken wie das Lymphozyten-Interferon, oder aber wie das CSa (6) und die lymphozytären chemotaktischen und migrationsinhibierenden Faktoren zur Attraktion von polymorphkernigen und mononucleären Leukozyten führen. Die zweite, nicht-spezifische Phase besteht nun in der Aktion dieser angelockten Leukozyten, die entweder direkt "toxisch" auf die Viren wirken oder aber die interzellulären Brücken sprengen, so daß eine Ausbreitung von Zelle zu Zelle verhindert wird. Auf diese Weise können die antiviralen Antikörper mit dem Complement dann die infizierten Zellen zerstören, bevor sich neue Interzellularbrücken gebildet haben. Die Leukozyten führen also die Ausbreitung von Zelle zu Zelle in einen rein extrazellulär verlaufenden Ausbreitungsmodus über. Zu dieser Form der Interaktion sind eine große Zahl von Leukozyten notwendig. (Verhältnis von Leukozyten zu Kaninchennierenzellen ist größer als 2,5) Dieses Verhältnis konnte jedoch drastisch verkleinert werden (kleiner als 0,1) wenn statt der Casein-induzier-

ten Peritonealzellen PPD-stimulierte oder Hvh-sensibilisierte Zellen verwandt wurden (89). Obwohl einmal unspezifisch, das andere Mal spezifisch "induziert", basierte die erhöhte Effektivität der Zellen in beiden Fällen auf demselben Mechanismus, nämlich der Bildung großer Mengen von Interferon (89).

In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, daß Jamuni & Holden (186) bereits 1934 die Interaktion von Leukozyten und humoralen Antikörpern mit den Herpesviren untersucht hatten, indem sie die beiden Komponenten einzeln oder in Kombination einer Virussuspension bekannter Ausgangsinfektiosität zugaben, deren Infektiosität sie nach bestimmten Inkubationsperioden wiederum durch intracerebrale (i.c.) Inokulation in Mäuse titrierten. Sie kamen dabei zu Ergebnissen, die die späteren von Lodmell et al. (89) dahingehend vorwegnahmen, daß sie eine gesteigerte antivirale Kapazität bei kombinierter Gabe von humoralen Antikörpern und Leukozyten zu der Virussuspension und eine höhere Effektivität immuner Zellen beobachteten. Sie stellten weiterhin fest, daß die mononucleären Zellen, wobei es sich hier allerdings um Alveolarmakrophagen handelte, von größerer Wirksamkeit waren als polymorphkernige Leukozyten.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Lodmell et al. gelangten auch Rouse & Babiuk (139) bei ihren Untersuchungen mit dem Virus der infektiösen Rhinotracheitis, einem rinderpathogenen Herpesvirus. Sie konnten nachweisen, daß die Bildung von Plaques auf Rinderfibroblasten durch Zugabe muriner, Stärke-induzierter PEC unterdrückt werden konnte. Ebenso wie Lodmell et al. stellten sie jedoch fest, daß die Plaques nach Entfernung der Makrophagen wieder auftraten.

Neben diesen in-vitro-Modellen gibt es auch eine Reihe von Untersuchungen in vivo, die die wichtige Rolle der Makrophagen bei der Abwehr der Herpesinfektion unter Beweis stellen: Die höhere Empfänglichkeit der Säuglingsmaus gegenüber Herpesinfektionen ist ein seit langem bekanntes Phänomen der Herpesforschung (1, 75). Johnson (70) untersuchte mittels immunfluoreszenzserologischer Methoden die Pathogenese der Herpesenzephalitis in der Säuglingsmaus mit einem Typ-1-Stamm (HFEM). Bei intraperitonealer (i.p.) Inokulation erschien das Antigen bereits nach sechs Stunden in den Peritonealmakrophagen, in der folgenden Zeit griff die Infektion auch auf die Serosaoberfläche und schließlich auf das Parenchym von Leber und Milz über. Nach 96 h traten fluoreszierende Herde in den Neuronen und Gliazellen des Gehirns auf, während Meningen und Ependym freiblieben. Die Läsionen im Gehirn lagen tief im Gewebe und zeigten keinerlei Beziehung zu den Nervenleitungsbahnen, vielmehr lagen die Orte des primären Virusbefalls innerhalb oder nahe des Endothels der kleinen Blutgefäße. Johnson schloß hieraus auf eine hämato gene Ausbreitung der Herpesviren zum ZNS nach i.p. Inokulation, während er bei der subcutanen Inoculation wegen des Fehlens einer Beteiligung der Eingeweide und einer Virämie den Ausbreitungsweg über die peripheren Nerven für am wahrscheinlichsten hielt. Ebenso wie Johnson wiesen Rajcani et al. (126) bei Säuglingsmäusen das Auftreten von fluoreszierenden Peritonealmakrophagen nach, allerdings erst am zweiten bis dritten Tag post infectionem (p.i.). Am vierten bis sechsten Tag fanden sie eine spezifische Fluoreszenz in den Schwannschen Zellen der vegetativen Nerven in der Bauch- und Brusthöhle, aber auch in den Spi-

nalnerven und im Rückenmark. Vom Gehirn war nur der Hirnstamm befallen. Im Gegensatz zu Johnsons Auffassung hielten die Autoren auch für die i.p.-Inoculationsroute die aszendierende Infektion des Gehirns entlang den Myelinscheiden der peripheren Nerven innerhalb der Schwannschen Zellen für den bevorzugten Weg.

Da für beide Theorien (70, 126) immunfluoreszenz-histologische Nachweise vorliegen, können wir annehmen, daß bei der i.p. Herpesinfektion der Säuglingsmaus sowohl eine hämatogene als auch eine aszendierende Ausbreitung des Virus erfolgen kann und daß beide Wege bei der Infektion des ZNS miteinander konkurrieren.

Verglichen mit der hohen Empfänglichkeit der Säuglingsmäuse stellte Johnson einen markanten Unterschied fest, wenn er junge, fünf Wochen alte Erwachsenenmäuse mit dem Hvh-1-Stamm HFEM infizierte: Während die LD 50 für die intracerebrale Infektion sich nur etwa in dem Maße erhöhte, wie es der Zunahme des Organgewichtes entspricht, stieg die LD 50 für die periphere Infektion um das 1000-fache an (70). Nach i.p. Inokulation war zwar die Anzahl der infizierten Makrophagen in adulten und Säuglingsmäusen dieselbe, während aber die Makrophagen der Babymäuse die Infektion an ihre Nachbarzellen weitergaben, taten dies die Zellen der adulten Tiere nicht. Da auch im Bindegewebe und in den Schleimhäuten des Respirationstraktes die Makrophagen eine wichtige Kontrollfunktion gegenüber in den Organismus eingedrungenen Erregern ausüben, folgerte Johnson, daß die mit zunehmendem Alter sich kontinuierlich entwickelnde Resistenz der Mäuse gegenüber der peripheren Inokulation Ausdruck eines Reifungsprozesses der Ma-

krophagen sei. Wenn diese Makrophagenbarriere - beispielsweise durch sehr hohe Virusdosen - einmal überwunden ist, besteht kein Unterschied mehr in der Virusausbreitung bei Erwachsenen- und Babymäusen (6).

Der starken Pathogenität der Herpesviren für die Säuglingsmäuse entspricht in der menschlichen Pathologie die schwere generalisierte Herpesinfektion des Neugeborenen, die es sich beim Durchtritt durch die mütterlichen Geburtswege zuziehen kann. Auch für dieses Krankheitsbild wird in der Ätiologie die Unreife der kindlichen Makrophagen diskutiert (6, 197).

Weitere Hinweise auf die Rolle der Makrophagen in der Pathogenese der Herpesinfektion lieferte die Arbeitsgruppe von Hirsch, Zisman & Allison (63, 179): Sie behandelten junge adulte Mäuse mit Antimakrophagenserum oder Silikat, zwei Substanzen, die zwar beide gegen die Makrophagen gerichtet sind, sich aber in ihrem Wirkungsmechanismus doch unterscheiden. Während das AMS die Makrophagen direkt zerstört, werden die Silikatpartikel phagozytiert und treten mit den lysosomalen Membranen im Zellinnern in Interaktion. Dies bewirkt die Freisetzung der Hydrolasen ins Zytoplasma und damit eine Autodigestion. Da das Silikat nicht metabolisiert wird, kann es nach der Auflösung des einen, zerstörten Makrophagen vom nächsten phagozytiert werden und stellt somit ein lang wirkendes "Gift" dar (4, 118). Beide Mittel - das AMS ebenso wie das Silikat - führten bei den vorbehandelten Tieren zu einer früher einsetzenden und insgesamt höheren Mortalität als in der Kontrollgruppe. Die behandelten Tiere entwickelten eine progressive nekrotisierende Hepatitis, vom zweiten Tag ab

auch eine mäßige Meningitis und Enzephalitis. Wurden die Tiere dagegen mit Antilymphozytenserum behandelt, so waren am Ende des Versuches zwar auch mehr Tiere gestorben als in den Kontrollen, die Todesfälle setzten jedoch nicht früher ein, es fehlten auch die Zeichen einer Hepatitis, dagegen entwickelte sich vom fünften Tag ab eine schwere Meningoenzephalitis, die schließlich zum Tod der Tiere führte. Während also AMS und Silikat die Makrophagenbarriere niederbrachen und so eine bessere Virusausbreitung in die primär-affinen Organe ermöglichten, steigerte das Antilymphozytenserum die Intensität und die Dauer der Virämie und bewirkte so - nach Meinung der Autoren - eine vermehrte Penetration der Erreger ins ZNS, die wiederum eine verstärkte Zerstörung von Ganglien- und Gliazellen zur Folge hatte.

Durch den Transfer adulter Makrophagen gelang es Zisman et al., die Säuglingsmäuse resistenter gegen eine Herpesinfektion zu machen. Eine Abnahme der totalen Mortalität war jedoch nur dann zu erreichen, wenn 6×10^6 Proteose-Pepton-stimulierte PEC übertragen wurden. Eine geringere Menge stimulierter oder aber auch sehr hohe Zahlen von normalen, nicht aktivierten Makrophagen konnten nur eine Protrahierung des Verlaufs, aber keine Senkung der Sterblichkeitsrate bewirken. Eine Übertragung von Peritoneal-Lymphozyten oder die Applikation von Proteose-Pepton i.p. direkt an die Babymäuse blieben ganz ohne Effekt. Die Proteose-Pepton-stimulierten Makrophagen adsorbierten 100 mal mehr Virus als normale und setzten gleichzeitig weniger Virus frei, d.h. die intrazelluläre Zerstörung des Virus war effektiver. Außerdem produzierten die stimulierten Makrophagen mehr Interferon, das zwar kei-

nen protektiven Effekt auf die Phagozyten selbst hatte, wohl aber andere Zellen, z.B. Fibroblasten schützte. Das Interferon kann aber nicht der einzige Faktor sein, der für die antivirale Kapazität der Makrophagen verantwortlich ist, da sie nicht nur eine Infektion von Zellen der gleichen Tierart, sondern auch eine von Zellen einer fremden zu verhindern vermochten (63).

In diesem Zusammenhang interessieren die Befunde von Argyris (7), der durch Übertragung adulter, TM-stimulierter Peritonealmakrophagen in drei Tage alte C3H/He-Mäuse eine erhöhte Antikörperproduktion gegen sensibilisierte Schafererythrozyten erzielen konnte. Der immunologische Defekt in den Säuglingsmäusen beruht also nicht auf einem Fehlen immunkompetenter Zellen, sondern auf dem Fehlen eines Systems, das für die Antigenerkennung bzw. -aufbereitung zuständig ist, nämlich funktionstüchtiger Makrophagen.

Hirsch et al. (63) stellten weiter fest, daß Makrophagen von Säuglingsmäusen nicht stimulierbar sind und erwogen die Möglichkeit, daß gerade die Stimulierbarkeit in enger Beziehung zu der fundamentalen Veränderung im Reifungsprozeß dieser Zellen stehen könnte.

Analog zu diesen Untersuchungen mit dem Hvh-1-Stamm HFEM fanden Selgrade & Osborn (147) eine Steigerung der Mortalitätsrate für einen Stamm des Mäusecytomegalievirus (MCMV) nach Gabe von Silikat kurz vor der Infektion. Der Transfer von TM-stimulierten Makrophagen erhöhte die Resistenz gegen das MCMV. Im Unterschied zu der Herpesinfektion bewirkten allerdings auch syngenetische nicht immune Lymphozyten einen zwar geringeren, aber deutlich protektiven Effekt auf Baby-

mäuse. Es erscheint an dieser Stelle notwendig, auf die offenbar recht komplexe Wirkung des in zahlreichen Versuchsmodellen angewandten Silikats näher einzugehen. Während die bisher in diesem Zusammenhang genannten Arbeiten (4, 118, 147, 179) die Annahme nahelegen, daß das Silikat über eine toxische Schädigung der Makrophagen diese erste Barriere im Peritoneum zerstört und so zu einer ungehinderten Virusausbreitung in die empfänglichen Gewebe führt, lassen Untersuchungen von DuBuy (30) auch noch eine andere Vorstellung über den Wirkungsmechanismus der Substanz zu: Er benutzte einen anderen Herpesstamm als Zisman et al., VR-4, der jedoch ebenfalls zum Typ 1 gehört. Wiederum stellte er fest, daß die Gabe von Silikat 24 hr ante infectionem (a.i.) die Mortalität in vivo erhöhte. Ebenfalls konnte er bestätigen, daß Silikat, in vitro auf Makrophagenkulturen gegeben, die Zellen zerstörte. Verglich er jedoch die Peritonealexsudate von vorbehandelten und Kontrolltieren 24 h nach der Virusinfektion, so fand er mehr Makrophagen in den Bauchhöhlen der mit Silikat vorbehandelten Tiere und auch einen höheren Virusgehalt dieser Zellen. Mit weiteren Experimenten gelang der Nachweis, daß Silikat in einem Zeitraum von der sechsten Stunde bis fünf Tage nach der Applikation einen stimulierenden Effekt auf die PEC hat, der sich in vivo in einem erhöhten Zellreichtum des Peritoneums verbunden mit einem Anstieg des Anteils der Makrophagen manifestierte.

Wie kompliziert es ist, ein einheitliches Konzept für die Interaktion der Substanz mit den Herpesviren zu entwickeln, zeigen auch die Befunde von Higgins & Calnek (60): Intraperitoneale Inokulation von Silikat sechs Tage vor der Virusbe-

handlung verzögerte das Auftreten der Todesfälle und reduzierte die Gesamtmortalität innerhalb der Beobachtungsphase (88 Tage) nach Injektion eines Stammes von Marek's Disease in junge Küken. Vier Wochen alte Vögel wurden dagegen bezüglich ihrer Empfänglichkeit nicht beeinflusst. Die Autoren konnten zum Zeitpunkt der Infektion ebenfalls das Vorliegen einer stimulierten Makrophagenpopulation nachweisen.

Der genaue Zeitpunkt, zu dem der deletäre Effekt des Silikats in vivo in den stimulierenden umschlägt, bleibt im Dunkeln. DuBuys Befunde, daß bereits 6 h nach der Applikation der Substanz eine erhöhte Anzahl von Makrophagen zu finden sei, erscheinen insofern verwunderlich, als das Silikat in seiner Eigenschaft, immer neue Makrophagen im Recycling-Verfahren zu zerstören, ein Langzeitgift darstellt. So konnten Pearsall & Weiser (118) einen Anstieg des Anteils der Makrophagen im Peritonealexsudat erst drei bis vier Tage nach der Silikatvorbehandlung feststellen. Wahrscheinlich spielt auch die durch den Abtransport der Substanz ins RES abnehmende Konzentration für die resultierende Wirkung eine wichtige Rolle. Offenbar sind aber die Effekte des Silikats aufgrund seiner ambivalenten Eigenschaften in hohem Maß vom jeweiligen Versuchsaufbau, vielleicht auch vom verwendeten Mäusestamm abhängig.

1.2.2. Hvh-1 und Hvh-2 - Typenunterschiede

Da wir uns in unseren Experimenten sowohl in vitro als auch in vivo in der Regel parallel mit Vertretern der beiden Typen des Herpesvirus hominis beschäftigt haben, sollen hier die wichtigsten Unterschiede, soweit sie für das Verständnis des Folgenden notwendig sind, kurz referiert werden:

Die Einteilung des Hvh in zwei Typen entstand aufgrund antigenetischer Unterschiede (105, 146). Nach Nahmias et al. (105) haben die Oberflächenantigene der beiden Stämme eine gemeinsame und eine unterschiedliche Komponente. Vergleichende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß es neben diesen serologischen auch noch eine Reihe weiterer Differenzen gibt, die die beiden Typen voneinander unterscheiden lassen.

Die Typ-2-Stämme wurden meist von genitalen Läsionen oder in Fällen von generalisierten Herpesinfektionen beim Neugeborenen isoliert. Auch im zweiten Fall ist das Virus letztlich genitalen Ursprungs, da es auf das Neugeborene beim Durchtritt durch die mütterlichen Geburtswege übertragen wurde (184, 197). Der Typ 1 wird dagegen in der Regel bei herpetischen Läsionen in der Mundhöhle und an den Lippen, beim Ekzema herpeticum, aber auch bei Enzephalitiden im Kindes- und Erwachsenenalter gefunden (28, 106).

In vitro zeigen die beiden Typen in der Regel eine unterschiedliche Morphologie der viralen Plaques (40, 120, 140). In Kaninchennierenzellen, aber auch in embryonalen Mäusefibroblastenkulturen haben die Hvh-2-Stämme eine geringere Vermehrungstendenz (106, 120, 121, 129, 40, 100). Die Gründe hierfür liegen - neben einer geringeren Produktion von Hvh-2-Viren

Überhaupt - zum einen in einer schnelleren Inaktivierung der Partikel (s.u.), zum anderen laut Figueroa & Rawls (40) in einer größeren Anzahl defekter Teilchen. Das Verhältnis der totalen Partikelzahl zur Infektiosität beträgt dementsprechend für die Typ-1-Stämme ungefähr $1,4-5,8 \times 10^1$, für den Typ 2 jedoch $1,4-2,4 \times 10^3$ (40). Die Hvh-2-Stämme zeigen offenbar eine größere Labilität gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Sie werden sowohl bei 37°C als auch bei -70°C schneller inaktiviert als die Typ-1-Viren (32, 40, 120, 121, 90, 106). Im Gegensatz hierzu fanden Smith et al. (152) eine schnellere Inaktivierung eines Typ-1-Stammes bei 45°C. Dagegen scheint die Empfindlichkeit gegenüber pH-Einflüssen ein stammspezifisches Charakteristikum zu sein (79, 136).

Gegenüber sulfatierten Polyanionen zeigen die Hvh-2-Stämme nach Hutton et al. (65), Nahmias et al. (111), Nahmias & Roizman (110) ebenfalls eine höhere Empfindlichkeit, während Plummer et al. (120) Gegenteiliges feststellten.

Auch im embryonierten Hühnerei verhalten sich die beiden Hvh-Typen unterschiedlich: Die Typ-2-Stämme bilden größere Plaques, während die Typ-1-Stämme nur kleine Plaques hervorrufen, die allerdings im Laufe häufiger Passagen die Tendenz zeigen, an Größe zuzunehmen (42, 135, 165). Über die Plaque-morphologie auf der Chorioallantoismembran hinaus führt jedoch der Typ 2 zu tiefgreifenderen Veränderungen: Die Infektion breitet sich auf das gesamte Ei aus, es kommt zu einer Blutung und zum Tod des Hühnerembryos. Bei der Inokulation von Typ-1-Stämmen bleibt die Infektion dagegen auf die Chorioallantois beschränkt und das Küken entwickelt sich weiter, ohne Schaden zu nehmen (92).

Auch in der Pathogenese der Herpeserkrankung der Maus bestehen typenspezifische Differenzen. Die Typ-2-Stämme führen mit großer Regelmäßigkeit in zahlreichen Mäusestämmen nach i.p., aber auch nach intravenöser (i.v.) Infektion zur Bildung makroskopisch sichtbarer fokaler Lebernekrosen, in denen sich virale Einschlusskörperchen finden (165, 132, 99, 100, 101). Solche Nekrosen werden bei Infektionen mit Typ-1-Viren nicht beobachtet, selbst Babymäuse bleiben frei von diesen Läsionen (99).

Hill et al. (61) und Plummer et al. (119, 120) berichten über eine höhere Neurovirulenz der Typ-2-Stämme, die die der Typ-1-Stämme bei peripherer Inokulation um das Hundertfache, bei intracerebraler um das Zehnfache übersteigt. Als mögliche Ursache für diesen Tatbestand wurden eine schnellere und intensivere Vermehrung des Typ 2 im Hirngewebe, aber auch das Hervorrufen einer schwächeren Interferonantwort diskutiert (121). Nach Lerner & Bailey (81) kann diesen Möglichkeiten noch eine dritte hinzugefügt werden, nämlich die, daß die Typ-2-Viren - nach abgeschlossener Adsorptionsphase - fünf bis zehn mal weniger empfindlich gegenüber dem Interferon sind als die Typ-1-Stämme. Bei diesen Angaben sollte man jedoch berücksichtigen, daß die in pfu angegebene Infektionsdosis niedrigere Virustiter für die Hvh-2-Inokula vortäuschen kann (s.o.). Plummer et al. (121) haben zwar versucht, diese mögliche Fehlerquelle durch Infektion mit mehr pfu der Hvh-1-Stämme auszugleichen, dennoch bleibt dieser Störfaktor in seiner quantitativen Bedeutung inkommensurabel. Nach Hill (61) kommt es bei intradermaler Inokulation von Herpesviren in den ersten fünf Tagen bei beiden Typen zu einem prinzipiell gleich-

artigen Ablauf der Infektion, dann jedoch zeigen die Typ-2-Viren die Tendenz, länger zu persistieren.

Craig & Nahmias und Nahmias & Roizman (24, 110) halten aufgrund von klinischen und laborchemischen Untersuchungen am Menschen zwei grundsätzlich verschiedene Ausbreitungsmodi der beiden Typen zum ZNS für möglich, nämlich den neurogenen für den Typ 1, für den Typ 2 dagegen den hämatogenen. Diese Annahme konnte aber im Tierexperiment nicht bestätigt werden.

Viele der genannten Unterschiede zwischen den beiden Hvh-Typen stellen sogenannte "biologische Markereigenschaften" dar, mit deren Hilfe man die Unterschiede zwischen beiden Gruppen herausstellen will. Dennoch haben nicht alle Autoren so viele verschiedene Stämme getestet, um mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit sagen zu können, daß es sich bei der getesteten Eigenschaft tatsächlich um ein typen- und nicht um ein stammspezifisches Charakteristikum handelt. Außerdem lassen sich auch bei anerkannten Markereigenschaften, wie z.B. bei der höheren Temperaturlabilität der Hvh-2-Viren, immer Gegenbeispiele in Form von sich atypisch verhaltenden Stämmen finden. Solche Befunde sind dann nicht als Gegenbeweis zu interpretieren, sondern eher als eine Ausnahme, die die Regel bestätigt.

1.3. Die Rolle der Makrophagen bei anderen Virusinfektionen

Auch bei einer Reihe von anderen Virusinfektionen haben die Makrophagen innerhalb der Abwehrmechanismen des befallenen Organismus eine wichtige Funktion: Analog zu dem bereits für die Herpesinfektion beschriebenen Versuchsaufbau untersuchten Rager-Zisman & Allison (123, 124) auch die Pathogenese der Coxsackie-B3-Infektion in der Maus. Wiederum konnte durch Übertragung von Proteose-Pepton-stimulierten Makrophagen vor der Virusinokulation die Mortalität der Säuglingsmäuse gesenkt werden. Bei Gabe nach der Infektion konnten die Makrophagen die Todesfälle nur in Kombination mit antiviralen Antikörpern vermindern. Den starken Einfluß der humoralen Abwehr bei der Bekämpfung dieser Enterovirusinfektion belegt auch die deletäre Wirkung einer einmaligen Gabe von Cyclophosphamid auf den Krankheitsverlauf in adulten Mäusen und die Aufhebung dieses Effektes durch die Gabe von Antiserum. Auch die Coxsackie-Viren wurden von den stimulierten Makrophagen schnell inaktiviert.

In gleicher Weise konnte für die Gelbfieberinfektion (180) unter der Applikation von Antilymphozytenserum, das wirkungslos blieb, und Silikat, das die Mortalität erhöhte, dessen Wirkung aber durch humorale Antikörper antagonisierbar war, nachgewiesen werden, daß bei dieser Arboviruserkrankung zwei Schutzmechanismen in Aktion treten, um das Virus an seinem Eindringen in empfindliche Gewebe zu hindern, nämlich die Makrophagen am Ort des Eintritts in den Organismus und die Antikörper im Blut, während die zelluläre Immunantwort offenbar von geringerer Bedeutung ist.

Turner & Ballard (161) gelangten bei ihren Untersuchungen über die Bedeutung der Peritonealmakrophagen bei der experimentellen Rabiesinfektion ebenfalls zu Ergebnissen, die mit denen für die Herpesviren in Analogie stehen: Die Silikatvorbehandlung erhöhte die Pathogenität der Erreger; der Transfer von - hier allerdings unstimulierten - Makrophagen adulter Tiere verringerte die Mortalität der Säuglingsmäuse zwar nicht endgültig, verzögerte jedoch das Eintreten der Todesfälle. Der Einfluß des Silikats beschränkte sich auf die intraperitoneale Inokulationsroute, auch der Transfer von Peritonealmakrophagen an intramuskuläre Injektionsstellen blieb für adulte Mäuse ohne protektiven Effekt. In vitro ergab sich ebenfalls eine Parallele zu den Herpes- und Coxsackie-Infektionen: Infizierte Makrophagen von Babymäusen gaben die Infektion an suszeptible Zellen weiter, solche von Erwachsenenmäusen aber nicht.

Für keines der bis hierher genannten Viren konnte - ebenso wenig wie für die Herpesinfektion - eine signifikante Vermehrung in den Makrophagen nachgewiesen werden (6, 123). Man nahm daher in allen Fällen einen abortiven Vermehrungszyklus in diesen Zellen an.

Ein Beispiel für die Interaktion von Makrophagen und Lymphozyten zeigte Blanden (16) anhand der Mäusepockeninfektion. Nach passiver Immunisierung der Mäuse durch immune Milzzellen oder Hyperimmunserum wanderten Makrophagen in die virusinfizierten Herde in der Leber ein und führten zur Destruktion des Virus. Die spezifisch sensibilisierten Lymphozyten konnten allein die Virusvermehrung nur verzögern, zur endgültigen Sanierung der Foci wurden mononucleäre Zellen ge-

braucht. Dies macht deutlich, daß die von Notkins für das Herpesvirus konzipierte Zweiphasenantwort auch für eine Reihe von anderen Virusinfektionen das gültige Prinzip darstellt. Wiederum liegt eine spezifische Antigen-Erkennungsphase - hier von den T-Zellen repräsentiert - und eine unspezifische, von den Makrophagen vermittelte Effektorphase vor.

Aber nicht nur die Lymphozyten, sondern auch die Makrophagen selbst können eine spezifische Reaktivität in immunologischem Sinne besitzen. Am Beispiel der Vaccinia-Infektion zeigten Tompkins et al. (159), daß die Migration der Makrophagen nicht nur dann gehemmt wurde, wenn immune Lymphozyten zusammen mit normalen Makrophagen inkubiert wurden, sondern auch dann, wenn Makrophagen von immunisierten Tieren allein dem Vaccinia-Antigen ausgesetzt waren. Das Vaccinia-Virus konnte sich in normalen Makrophagen vermehren, tat dies jedoch nicht in immunen Zellen. Koszinowski et al. (78) modifizierten den letzten Befund insofern, als auch sie eine Restriktion der Virusvermehrung in Vaccinia-immunen Makrophagen fanden, die sich in ihrer Intensität jedoch nicht von der in mit einem anderen DNA-Virus (z.B. Herpes) sensibilisierten Zellen unterschied.

Im Gegensatz hierzu konnten Ektromelieviren immune Makrophagen sogar besser infizieren als normale, wahrscheinlich deshalb, weil die ersteren aufgrund ihrer nachgewiesenen erhöhten Phagozytoseleistung mehr Virus aufnahmen. Es gab keinerlei Hinweise auf eine stärkere Inaktivierung der Viren in den immunen Zellen (133).

Anhand der Mäusehepatitis- und Ektromelieinfektion wurde versucht, eine Korrelation zwischen der Vermehrbarkeit der

Viren in den Makrophagen und ihrer Pathogenität in vivo herzustellen: Allison & Mallucci (183) zeigten, daß ein virulenter Stamm des Mäusehepatitisvirus (MHV-3) sich in den Makrophagen vermehrte und sie zerstörte, während ein avirulenter (MHV-1) dies nicht tat (6). In jüngerer Zeit fanden allerdings Eustatia et al. zwei Stämme mit unterschiedlicher Virulenz in vivo, die sich in den Makrophagen in vitro gleich gut vermehrten (34). Für zwei Ektromeliestämme unterschiedlicher Virulenz wies Roberts nach, daß nach intravenöser Inokulation nur der pathogene Stamm die Kupfferschen Sternzellen infizierte. In vitro waren die Peritonealmakrophagen zehn mal mehr empfänglich für den pathogenen als für den apathogenen Stamm.

Weitere Viren, deren Vermehrung in den Makrophagen nachgewiesen ist, sind das Virus der Stomatitis vesicularis, das Mengovirus und ein Reovirus vom Typ 3 (34). Das Lactic-Dehydrogenasevirus und die Viren der lymphozytären Choriomeningitis und des Aleutian Mink Disease nehmen insofern eine Sonderstellung ein, als sie sich in den Makrophagen zwar vermehren, jedoch nicht zu einem zytopathischen Effekt und zum Tod der Zelle führen. Allison et al. (5) und Silverstein (150) stellen dieses Verhalten in Zusammenhang mit der Persistenz, die alle durch diese Viren hervorgerufenen Infektionen gemeinsam haben.

1.4. Die genetische Resistenz gegenüber Virusinfektionen - Wichtige Modelle

Anhand des Modells der Mäusehepatitisinfektion konnte nicht nur gezeigt werden, daß die Pathogenität der Erreger in vivo ein Korrelat in der Vermehrbarkeit der einzelnen Stämme in den Makrophagen in vitro hatte, sondern Bang, Kantoich & Warwick entdeckten auch, daß sich die genetische Resistenz der verschiedenen Mäusestämme in vivo in dem Vermehrungsverhalten der Viren in vitro widerspiegelte (11, 73). Die Autoren hatten diese Versuche zunächst mit Lebermakrophagen aus Babymäusen gemacht, sie kamen jedoch zu demselben Ergebnis, wenn sie Peritonealzellen vier Wochen bis ein Jahr alter Tiere testeten. Mittels eines Extraktes aus den Makrophagen empfänglicher Tiere konnten resistente Makrophagen vorübergehend susceptibel gemacht werden, dagegen gelang es nicht, empfängliche Makrophagen durch einen Extrakt aus resistenten Zellen unempfindlich zu machen (72). Neuere Befunde von Virelizier & Allison (169) erweitern das alte Modell dahingehend, daß es in vivo gegenüber dem Stamm MHV-3 neben total resistenten und vollkommen empfänglichen Tieren, die an einer akuten Hepatitis sterben, noch eine dritte Gruppe von Mäusestämmen gibt, in denen das Virus eine persistierende Infektion mit neurologischer Symptomatik erzeugt. Diesen in-vivo-Befunden entspricht eine ebenfalls intermediäre Verhaltensweise der Makrophagenkulturen in vitro, und zwar hinsichtlich des zytopathischen Effektes, der Präsenz von viralen Antigenen und des Ausmaßes der Virusvermehrung.

Indessen erscheint es bemerkenswert, daß genetisch gegenüber dem MHV resistente Mäuse phänotypisch empfänglich ge-

macht werden können durch Substanzen wie Cortison und Cytoxan, also Wirkstoffen, die eher die Lymphozyten als die Makrophagen schädigen, während die Makrophagen der behandelten Tiere in vitro resistent bleiben (169). Es ist möglich, daß hiermit die Beobachtung in Zusammenhang steht, daß resistente Makrophagen durch Inkubation mit der Kulturflüssigkeit allogenetischer Lymphozyten um das 1000-fache empfänglicher für das Virus gemacht werden. Wahrscheinlich wird dieser Effekt durch Lymphokine vermittelt (175).

Die genetische Resistenz gegenüber den Arboviren erweist sich dagegen als ein eher multifaktorielles Problem. Goodman & Koprowski (48, 49) hatten versucht, die genetische Resistenz gegenüber dieser Virusgruppe ebenfalls ausschließlich auf das Vermehrungsverhalten in den Makrophagen zurückzuführen. In ihren Untersuchungen mit dem Stamm E-101 der West-Nil-Enzephalitis und dem attenuierten Gelbfieberstamm 17 D entdeckten sie zwar wiederum eine Parallele zwischen der Vermehrbarkeit der Viren in den Makrophagen und der Empfänglichkeit der jeweiligen Mäusestämme in vivo. Die resistenten Makrophagen phagozytierten weniger Virus, vermehrten es schlechter und zeigten sich weniger empfindlich gegenüber der virusinduzierten Zelllyse. Aber auch bei intracerebraler Inokulation vermehrte sich das Virus in den resistenten und suszeptiblen Tieren unterschiedlich, die Gehirntiter lagen bei den resistenten Tieren um 1 bis 2 log-Stufen niedriger. Auch in den Nierenepithelzellen der resistenten Mäuse fand sich immunfluoreszenzserologisch weniger Virusantigen (49). Aus diesen Befunden folgt, daß Sabin bereits 1952 mit seiner Zweifaktorentheorie (141), in der er für die genetische Resistenz gegenüber den Arbo-B-Viren erstens einen vermehrungshemmenden Faktor (= Makrophagen),

zweitens aber auch einen der zellulären Vulnerabilität forder-
te, der Wahrheit nähergekommen war. Danach kann ein Virusstamm
die genetische Resistenz des Wirtes überwinden, indem er ent-
weder eine Variante entwickelt, die sich der Wirkung des ver-
mehrungshemmenden Faktors entzieht, oder aber indem es der
Virusvariante gelingt, bereits bei geringeren Vermehrungsra-
ten pathogen zu wirken (142). In späterer Zeit wurde die Un-
tersuchungsmethodik dadurch entscheidend verbessert, daß es
durch Rückkreuzung gelang, zwei kongene Mäusestämme, C3H/RV
und C3H/He zu züchten, die sich nur durch das Merkmal ihrer
unterschiedlichen Resistenz gegenüber den Arboviren unterschei-
den (55). Anhand dieser beiden Mäusestämme wiesen Hanson &
Koprowski nach, daß nach Infektion mit einem Stamm des WNV
in vitro die Zellen der suszeptiblen He- und der resistenten
RV-Mäuse zwar gleich viel endogenes Interferon produzierten,
daß aber die Empfindlichkeit der RV-Zellen gegenüber exogenem
Interferon größer war. Auch in vivo konnten RV-Mäuse schon
durch kleinere Interferonmengen vor einer sonst letalen In-
fektion geschützt werden als die He-Mäuse (59). Darnell und
Koprowski konnten jedoch die unterschiedliche Reagibilität
der beiden Mäusestämme auf exogenes Interferon nicht bestäti-
gen. Sie stellten aber fest, daß die embryonalen Fibroblasten-
kulturen der resistenten Mäuse nach der Infektion mit dem WNV
weniger Virus freisetzten als die der empfänglichen Mäuse.
Verantwortlich für diesen Effekt war der erhöhte Anteil von
inkompletten Teilchen in der Virussyntese der resistenten
Zellkulturen, wie anhand von Interferenzversuchen nachgewie-
sen wurde (25). Nach diesen Befunden wäre dann die geringere
Vermehrbarkeit der Viren in den resistenten Makrophagen nicht

mehr der entscheidende Stop in der Pathogenese der Infektion, sondern das Spiegelbild der allgemein erniedrigten Fähigkeit der Zellen resistenter Tiere, infektiöses Virus zu bilden. Diese Betrachtungsweise gibt auch den Einwänden von Gresser & Lang (52) gegen die Makrophagentheorie im Arbovirussystem nachträglich ihre Berechtigung, die bereits 1966 meinten, man könne die Ergebnisse auch so interpretieren, daß in vivo alle Zellen der resistenten Mäusestämme gegenüber dem Virus resistent seien, daß aber diese Eigenschaft unter den Kulturbedingungen in vitro unterschiedlich schnell und in unterschiedlichem Ausmaß verlorenginge. Als Beispiel für langes Erhaltenbleiben der Resistenz dienten die Makrophagen, aber auch das Hirngewebe (49, 174), als Beispiel für ihren schnellen Verlust die anderen somatischen Zellen der Mäuse.

Jacoby & Bhatt (13, 68) haben einen anderen Vertreter der Arbo-B-Viren, das Banzivirus, untersucht. Bei nahezu identischer i.p.-ID-50 für die He- und RV-Mäuse ergab sich ein Unterschied in der i.p.-LD-50 von fünf log-Stufen, die i.c.-LD-50 zeigte allerdings nur eine Differenz von einer log-Stufe, wobei aber die durchschnittliche Überlebenszeit bei den He-Mäusen 6,3, bei den RV-Mäusen dagegen 9,1 Tage betrug. Histologische Untersuchungen machten deutlich, daß die zelluläre Reaktion des Organismus den Krankheitsverlauf wesentlich beeinflusste. Nach i.p. Inokulation stieg der Virusgehalt im Gehirn der He-Mäuse schneller und zu höheren Endwerten an als der in den RV-Mäusen, die neuronale Degeneration war in den He-Mäusen entsprechend stärker. Im Gegensatz zu der Resistenz gegenüber dem WNV, wie sie Darnell & Koprowski (25) bereits für embryonale Fibroblasten beschrieben hatten, entwickelte sich

die Resistenz gegenüber dem Banzivirus erst in den ersten vier Lebenswochen. Gegenüber der zellulären Resistenz, die sich in der geringgradig unterschiedlichen i.p.-ID-50 und der um eine Zehnerpotenz differierenden i.c.-LD-50 manifestiert, hat demnach im Falle der Banzivirusinfektion eine immunologisch vermittelte Resistenz das Übergewicht, wie auch aus ihrer starken Beeinflußbarkeit durch Cyclophosphamid, subletale Röntgenbestrahlung oder T-Zell-Zerstörung hervorgeht. Die Abhängigkeit von Reifungsprozessen innerhalb der T-Zell-Population erklärt die Altersabhängigkeit der Resistenz.

Im Gegensatz zu dem Mäusehepatitis- und Arbovirusmodell ist die genetische Resistenz gegenüber der Infektion mit dem Mäusepockenvirus nicht an die Funktion des retikuloendothelialen Systems gekoppelt (133, 52). Die Makrophagen suszeptibler und resistenter Stämme sind in vitro gleich empfänglich für die Erreger. Schell (144, 145) stellte vielmehr fest, daß sie auf immunologischer Basis beruht. Aufgrund einer schnelleren humoralen Antikörperreaktion sind die C57 Bl-Mäuse gegenüber diesen Viren resistent.

Nach Angaben von Tosolini & Mims (160) erklärt sich die Resistenz der C-57-bl-Mäuse gegenüber der LCM-Infektion gerade aus dem entgegengesetzten Mechanismus, nämlich einer schwächeren Immunantwort und dementsprechend einer geringeren Gewebereaktion im ZNS der Tiere. Nach neueren Ergebnissen muß die Vorstellung, daß die LCM-Viren grundsätzlich unfähig seien, einen cytopathischen Effekt zu verursachen und nur die Immunantwort das krankmachende Agens darstelle, dahingehend modifiziert werden, daß das Ausbleiben eines cytopathischen Effektes nach der Infektion mit LCM-Viren wohl hauptsächlich auf

der Überzahl defekter interferonbildender Teilchen beruht, die bei der Virussynthese gebildet werden (36).

Ein weiteres Modell für eine Form der genetischen Resistenz liefert die Gruppe der Myxoviren. Lindenmann fand (84, 85), daß für die Resistenz der A2G-Mäuse ein Gen, das er Mx nannte, verantwortlich sei. Das Ausmaß der Resistenz variierte innerhalb der einzelnen Vertreter der Myxoviren von einer absoluten im Falle eines neurotrophen intracerebral verabreichten Stammes bis zu einer kaum meßbaren bezüglich eines anderen, intranasal gegebenen Stammes. Interessanterweise stellte der Autor jedoch fest, daß trotz des eindeutig dominanten Erbgangs des Mx-Gens die heterozygote F1-Generation aus resistenten und suszeptiblen Elternmäusen ihre Resistenz erst nach dem neunten Tag ausbildete, während die homozygoten A2G-Mäuse bereits am siebten Tag vollkommen resistent waren; die heterozygoten Mäuse unterlagen also einer verzögerten Reifung ihrer Resistenz.

Wie bei den Arboviren lag die Ursache der Resistenz der A2G-Mäuse gegenüber den Myxoviren nicht in der Unfähigkeit der Erreger, den Wirt zu infizieren. Bei intracerebraler Infektion waren die ID-50-Werte für empfängliche (ICR) und resistente (A2G-) Mäuse nahezu gleich, der Virusgehalt in den letzteren blieb jedoch im weiteren Verlauf um zwei Zehnerpotenzen unter dem der ICR-Tiere. Während die ICR-Mäuse vom sechsten bis achten Tag starben, sank der Titer in den A2G-Mäusen auf nicht mehr meßbare Werte ab. Ob diesem Abfall im Virusgehalt eine Immunantwort zugrundelag, konnte nicht entschieden werden.

Spätere Untersuchungen (58) mit einer i.p. inokulierten

hepatotropen Variante des Influenza-Virus ergaben histologische Unterschiede in den Lebern der resistenten A2-G- und der suszeptiblen ICR-Mäuse. Während die ICR-Lebern eine akute degenerative Hepatitis mit weitverstreuten Nekrosen nahezu ohne jede Entzündungsreaktion aufwiesen, zeigten die A2G-Mäuse nur einzelne kleine Leberzellnekrosen, wobei das Gewebe von einwandernden Phagocyten durchsetzt war. Überraschenderweise führte die Gabe von Cyclophosphamid, Methotrexat oder Procarbazin zum Ausbleiben dieser Infiltration, ohne daß jedoch die Nekroseherde eine Tendenz zur Ausbreitung gezeigt hätten (58). Ebenso blieb die Resistenz erhalten, wenn das retikuloendotheliale System durch die Gabe von Thoriumdioxid oder Silikat blockiert wurde (58). Die Entwicklung der genetischen Resistenz erwies sich aber auch als unabhängig von einer intakten Thymusfunktion (57).

Die genetische Resistenz ist auch innerhalb der Gruppe der Herpesviren ein bekanntes Phänomen. Diosi et al. (26) entdeckten einen Stamm des Mäusecytomegalievirus (MCMV) in Wildmäusen, der für Albino-Swiss-Mäuse intracerebral verabreicht nicht pathogen war. Selgrade & Osborn (147) arbeiteten mit einem MCMV-Stamm, der für Swiss- und C57-B1-Mäuse pathogen war, gegen den sich aber CBA-Mäuse als resistent erwiesen. Es ergaben sich keine Unterschiede bezüglich des Vermehrungsverhaltens der Viren in den Makrophagen empfänglicher und resistenter Tiere. Dagegen zeigte die histologische Prüfung der Lebern, daß eine differierende zelluläre Antwort für die unterschiedliche Empfänglichkeit verantwortlich war. Die inflammatorische Reaktion war in den C57-B1-Mäusen stärker als in CBA, andererseits zeigten aber auch die Herde bei den C57-

Mäusen eine größere Ausdehnung sowohl in die Portalfelder als auch ins Leberparenchym, während die Läsionen bei den CBA-Mäusen auf die Portalfelder beschränkt blieben. Silikat machte zwar die CBA-Mäuse empfänglicher gegenüber dem MCMV, aber auch die so vorbehandelten CBA-Mäuse blieben in ihrer Mortalitätsrate unter der der unbehandelten C57-Mäuse. Auch neugeborene CBA- waren bereits resistenter gegen das MCMV als C57-Baby-mäuse.

Kreuzungsversuche ergaben, daß die Resistenz gegenüber der i.p.-Inokulation des MCMV dominant vererbt wird (147). Zieht man gleichzeitig die Untersuchungen von Diosi et al. (26) (s.o.) in Betracht, nach denen bei i.c.-Inokulation die Suszeptibilität dominant war, so folgt daraus, daß die Mechanismen der genetischen Resistenz nicht nur für jedes Virus verschiedene sind und in anderen Mäusestämmen realisiert werden, sondern daß sie auch für dasselbe Virus je nach der Inokulationsroute, d.h. je nach dem Ort der primären Virusvermehrung, beziehungsweise je nach den dort wirksamen Eigenschaften der zuerst infizierten Zellen variieren können.

1.5. Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, angeregt durch bekannte Berichte aus der Literatur über Substanzen, die die Makrophagen schädigen, die Pathogenese der Herpesinfektion in adulten Mäusen unter der Applikation einer Substanz zu untersuchen, von der man weiß, daß sie die Makrophagen stimuliert. Untere Wahl fiel auf Thioglycollat-Medium (TM). Weiterhin ging es um die Frage, ob sich Herpesviren in den Peritonealmakrophagen normaler oder stimulierter Mäuse in vitro vermehren und ob, wenn ja, etwa analog zu den Befunden von Roberts (133) oder Allison & Mallucci (183) eine Korrelation zwischen der Vermehrung eines Virusstammes in vitro und seiner Pathogenität in vivo besteht.

Weitere Versuche galten der Suche nach einem Modell für die genetische Resistenz gegenüber den Herpesviren und der Aufklärung ihrer Natur.

Es liegt im Wesen eines so breit gefächerten Aufgabengebietes als notwendiger Folge eines so komplexen Wirtssystems, daß an vielen Stellen wichtige Fragen offen bleiben. Endgültige Antworten können oftmals nicht gegeben werden, vielmehr wird eine Anzahl von Interpretationsmöglichkeiten angeboten, über deren Richtigkeit letztendlich nur die weitere experimentelle Prüfung entscheiden kann.

2. Materialien und Methoden

2.1. Medien

Als Wachstums- und Kulturmedium haben wir in allen Versuchen Lahnmedium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum verwandt. Die Zusammensetzung von 5l der Stammlösung ist in Tabelle 2.1. dargestellt.

Alle Salze und die Glucose werden mit Aqua dest. zunächst getrennt gelöst und dann zusammengegeben. Dann wird das Lactalbumin hinzugesetzt, zum Schluß das Phenolrot. Nach der Einstellung des pH auf 7,2 wird die Lösung steril filtriert.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung gibt man auf 100 ml der Stammlösung 900 ml steriles Aqua dest. und 100 ml inaktiviertes Kälberserum. Kurz vor dem Gebrauch werden dem Medium je nach der Stoffwechselaktivität der Zell- und Kulturart 5-18 ml einer Bicarbonat- (Tabelle 2.3.) und 2 ml einer Antibiotikallösung (Tabelle 2.2.) hinzugefügt.

Zum Waschen von Zellkulturen und für die Titrationsen haben wir Hanks-Medium verwandt, das die Salze und die Glucose in der gleichen Konzentration wie das Lahn-Medium, jedoch kein Lactalbumin und kein Kälberserum enthält.

Tabelle 2.1. Menge der Substanzen in 5l der Lahn-Stammlösung

(10-fach)

NaCl	400 g
KCl	20 g
KH_2PO_4	3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	9,25 g
bzw. CaCl_2 wasserfrei	7 g
Glucose	50 g
Phenolrot-Na	1 g
Lactalbumin-Hydrolysat	125 g

Tabelle 2.2. Antibiotikallösung

Penicillin 200 000 Einheiten

(1 Ampulle = 10^6 Einheiten auf 5 ml steriles
Aqua dest., davon 1 ml auf einen Liter Medium)

Streptothetat 0,2 g

(1 Ampulle zu 1 g auf 5 ml steriles Aqua dest.,
davon 1 ml auf einen Liter Medium)

Tabelle 2.3. Bicarbonatlösung

Gebrauchskonzentration 7,5 %ig, demnach für 1 l

NaHCO_3	75,00 g
Phenolrot-Na	0,02 g

2.2. Zellen

2.2.1. Makrophagen

Zur Gewinnung der Makrophagen haben wir 6 bis 8-Wochen alte Mäuse verwandt. Sollten stimulierte Makrophagen geerntet werden, haben wir die Tiere 72 h vor der Entnahme mit 2 ml TM i.p. vorbehandelt.

Nach der Tötung der Tiere durch Genickbruch wird das Abdomen gut mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Das Fell wird aufgeschnitten ohne das Peritoneum zu verletzen. In die freigelegte Bauchhöhle werden - je nach der Größe der Maus - 3 bis 5 ml Lahnmedium mit 10 % Kälberserum unter Zusatz von 5 ml Bicarbonatlösung und 5 bis 10 IE Heparin pro ml injiziert. Nach vorsichtiger Massage und einigen Minuten Wartezeit aspiriert man die nunmehr mit Peritonealzellen angereicherte Flüssigkeit vorsichtig durch ein kleines Loch im Peritoneum mit einer 5 ml-Pipette.

Die Peritonealexsudate von 3 bis 10 Mäusen werden gepoolt und dann zu einem Volumen von 3 ml auf Plastik-Petrischalen (5 cm Durchmesser) ausgesät.

Nach zweistündiger Inkubation in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C werden die Kulturen einmal vorsichtig gewaschen und frisches Lahnmedium mit 10 % KS und 5 ml Bicarbonat pro l, aber ohne Heparin hinzugefügt.

Anschließend setzt man die Inkubation in der CO₂-Atmosphäre fort.

2.2.2. Embryonale Mäusefibroblasten

Zur Gewinnung der Mäusefibroblasten werden schwangere Mäuse im letzten Drittel der Gravidität verwandt. Nach sorgfältiger Desinfektion des Abdomens mit 70 %igem Alkohol wird das Fell abpräpariert. Mit einem neuen sterilen Besteck eröffnet man das Peritoneum und entnimmt steril den Uterus. In einer Petrischale mit steriler Hankslösung wird die Gebärmutter aufgeschnitten. Nach der Entnahme werden die Embryonen in frischer Hanks-Lösung gut gewaschen, um das Blut zu entfernen. Danach werden die Eihaut und - abhängig vom Entwicklungsstand der Feten - auch Kopf, Schwanz und Gliedmaßen und der Darm entfernt. Nach nochmaligem sorgfältigem Waschen zerteilt man die Rumpfe in einem kleinen Zentrifugenglas mit einer langen sterilen Schere so fein wie möglich. In einem kleinen Trypsiniergefäß erfolgt dann bei 37°C die Trypsinierung. Anschließend werden die Zellen in einem Verhältnis von 0,3 bis 0,4 ml Sediment auf 100 ml Medium in Kulturflaschen zu je 10 ml oder in Petrischalen ausgesät.

2.2.3. Kaninchennierenzellen

Zur Gewinnung der Kaninchennierenzellen werden junge Kaninchen im Alter von 5 bis 14 Tagen getötet und die Nieren steril entnommen. Die Kapsel und das Fett müssen sorgfältig abpräpariert werden. In einem Zentrifugenglas wird das Organmaterial möglichst fein zerkleinert. Bei 37°C erfolgt die Trypsinierung. Nach der Zentrifugation wird das Sediment in

2 ml Medium aufgenommen und die Zelldichte bestimmt. In der Regel werden die Zellen in einem Verhältnis von 0,8 ml dieser Suspension auf 1 l Medium in Rollrandröhrchen zu je 1,2 ml ausgesät. Nach drei Tagen nimmt man einen Mediumwechsel mit Lahn-Medium + 10 % KS unter Zusatz von 15 bis 20 ml Bicarbonatlösung vor.

2.3. Thioglycollat-Medium (TM)

Das für unsere in-vivo- und in-vitro-Versuche verwandte TM (Firma Merck, Artikelnummer 8191) hat folgende Zusammensetzung (in g pro Liter):

Pepton aus Casein	15,0
Hefeextrakt	5,0
D (+) - Glucose	5,5
L (+) - Cystein	0,5
NaCL	2,5
Natriumthioglycollat	0,5
Resazurin-Natrium	0,001
Agar-Agar	0,75

Das pH des gebrauchsfertigen Mediums beträgt bei 37°C $7,1 \pm 0,1$. Zur Zubereitung der Gebrauchslösung werden 30 g der Trockensubstanz in einem Liter destilliertem oder vollentsalztem Wasser suspendiert, 15 Minuten eingeweicht und bis zum völligen Auflösen im Dampftopf erhitzt. Nach Abfüllen in Portionen erfolgt die Sterilisation im Autoklaven.

2.4. Viren

In unseren in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen haben wir zahlreiche Stämme des Herpesvirus hominis getestet. Alle Viren wurden in primären Kaninchennierenzellen gezüchtet und passagiert. Auch für die in-vivo-Untersuchungen wurden keine mäuseadaptierten Stämme verwandt.

Tabelle 2.5.

<u>Stämme</u>	<u>CPE</u>	<u>Literaturangabe</u>
Hvh-1:		
Lennette	ZA, RZ	190, 191, 194, 196
IES	RZ	190, 191, 192, 194, 196
L3-2S	RZ	190, 194
Thea	ZA	194
Eckert	ZA	keine

intermediär:

ER	ZA, RZ	194
----	--------	-----

Hvh-2:

D-316	ZA	79, 193
DD	ZA, RZ	194

ZA = Zellabkuglung

RZ = Riesenzellbildung

2.5. Mäuse

In unseren Untersuchungen wurden vornehmlich zwei Mäusestämme verwandt, und zwar NMRI-Mäuse, (Zuchten in Kisslegg und Hannover) und C57-Black-6-Mäuse (Hannover).

Bei einigen Makrophagenversuchen wurden auch noch Balb c- und CBA-Mäuse (Institutszüchtungen) getestet.

Während die drei letztgenannten Spezies reine Inzuchtstämme sind, handelt es sich bei den NMRI-Mäusen um die Nachkommenschaft einer Kolonie von weißen Mäusen, die seit den Zwanziger Jahren gezüchtet wurden.

Für die in-vivo-Versuche wurden vier bis fünf Wochen alte, für die Makrophagengewinnung sechs bis zehn Wochen alte Tiere verwandt. Das Gewicht der Mäuse schwankte in der jüngeren Altersgruppe zwischen 18 und 25 g, in der älteren zwischen 22 und 30 g.

2.6. Organentnahmen

In einigen Versuchsreihen wurde der Virusgehalt in den einzelnen Organen der Mäuse bestimmt.

Dazu wurden je zwei Tiere aus einer Versuchsgruppe getötet, deren Organe im weiteren Verlauf gemeinsam untersucht wurden.

Nach der Desinfektion des Felles mit 70 %igem Alkohol wurde zunächst der Thorax eröffnet und der Thymus steril entnommen. Aus dem Abdomen wurde die Milz und - nach makroskopischer Inspektion und Zählung der auf der Oberfläche befindlichen Nekrosen - ein keilförmiges Stück der Leber entnommen.

Das Rückenmark wurde nach Präparation der Muskulatur und Eröffnung des Wirbelkanals mit einer spitzen Schere von lumbal bis cervical freigelegt und ebenfalls entnommen. Durch Abtrennen der Schädelkalotte mit einer Schere wurde das Gehirn freigelegt, an der Schädelbasis in Höhe des Kleinhirns abgetrennt und entnommen.

Alle Organe wurden gewogen und bei -70°C eingefroren.

2.7. Bestimmung der Infektiosität

2.7.1. Bestimmung des Virusgehalts im Überstand der Makrophagen- und Fibroblastenkulturen

Sämtliche Titrationen wurden auf primären Kaninchennierenzellen durchgeführt. Nach Einfrieren und Auftauen der Proben wurde das Material in Zehnerschritten verdünnt und zu 0,2 ml auf 1 bis 3 Rollrandröhrchen gegeben. Die Auszählung der Plaques erfolgte 48 h nach der Infektion, wobei die Röhrchen in den ersten 24 h bei 37°C , in den zweiten bei 32°C inkubiert wurden.

2.7.2. Organtitrationen

Die bei -70°C eingefrorenen Organe wurden aufgetaut und mit Hanks-Lösung 1:10 verdünnt. Nach mechanischer Zerkleinerung mittels eines Glasmörsers wurden die so entstandenen Suspensionen 8 sec ultrabeschallt und bei 4500 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden in Zehnerschritten auf

Kaninchennieren-Rollrandröhrchen wie bereits oben beschrieben titriert.

Im Gegensatz zu dem in 2.7.1. genannten Vorgehen wurde jedoch die Inkubation der Röhrchen bei 37°C bis zum achten Tag fortgesetzt, da die Ausbildung des Cytopathischen Effektes wegen toxischer Produkte in den Organsuspensionen mehr Zeit in Anspruch nahm. Hierbei war es nicht möglich, eine genaue Auszählung der Plaques vorzunehmen. Deshalb wurde nur zwischen viruspositiven und virusnegativen Röhrchen unterschieden.

2.8. Berechnung der Mittelwertreihen für die Makrophagen- und Fibroblastenversuche

Zur Untersuchung des Vermehrungsverhaltens der Herpesviren in den Makrophagen- und Fibroblastenkulturen wurde in mehreren Parallelversuchen ($n = 3$ bis 10) der Virusgehalt im Überstand der Kulturen zu festgesetzten Zeiten nach der Infektion (3 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h, 48 h, 72 h) durch Titration auf Kaninchennieren-Rollrandröhrchen bestimmt (vgl. 2.7.1.).

Um die Meßreihen aus den Parallelversuchen zusammenfassen zu können, wurden aus den logarithmierten Werten aller Parallelversuche zu einem bestimmten Zeitpunkt das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) gebildet (das dem geometrischen Mittel der Ausgangswerte entspricht) und die Standardabweichung berechnet.

Aus den $\bar{x}$ -Werten für alle Zeiten p.i. entstand somit eine Mittelwertkurve, die das Vermehrungsverhalten des betref-

fenden Virusstammes in der jeweiligen Kultur widerspiegelt.

Die so erhaltenen Mittelwertreihen wurden - in den Fällen, wo eine Vermehrungstendenz vorlag - mittels des t-Testes (208) auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Als unteren Bezugswert für den maximalen Titeranstieg wurde hierbei immer der 5-h-Wert angenommen. In einem Teil der Fälle ergaben sich infolge zu großer Streuungen keine signifikanten Differenzen ($p > 0.125$). Die beobachtete Vermehrung kann in diesen Meßreihen nur im Sinne eines Trends interpretiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. In-vitro-Untersuchungen: Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagen- und Fibroblastenkulturen

3.1.1. Die thermische Inaktivierung von Herpesviren während 72-stündiger Inkubation bei 37°C

Das Ziel unserer in-vitro-Untersuchungen war es herauszufinden, ob sich die Herpesviren in den Kulturen normaler und stimulierter Makrophagen und in den Fibroblasten verschiedener Mäusestämme vermehren können.

Dabei gingen wir so vor, daß wir die Zellkulturen infizierten, das Virus nach zwei Stunden durch Waschen wieder entfernten und den Virusgehalt im Überstand der Kulturen zu festgesetzten Zeiten nach der Infektion bestimmten.

Es war daher zunächst von Interesse festzustellen, in welchem Maße die thermische Inaktivierung allein den Virusgehalt im Überstand beeinflußt.

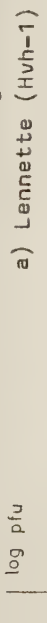
Um dies zu prüfen, haben wir zunächst Virussuspensionen von bekanntem Ausgangstiter (Oh-Wert) bei 37°C inkubiert, nach 3 h, 12 h, 24 h, 32 h, 48 h und 72 h Proben entnommen und diese auf primären Kaninchennierenzellen titriert.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 6.14 (S. 188) und die Abb. 3.1. zeigen, findet sowohl für den Typ-1-Stamm Lennette als auch für den Typ-2-Stamm D-316 eine signifikante Titerreduktion statt ($p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$), die nach 72 h für Len zwei, für D-316 jedoch drei Zehnerpotenzen umfaßt. Dabei bleibt der Titer für den Stamm Len in den ersten 24 h fast konstant und fällt erst zwischen 24 und 48 Stunden steiler ab, während wir bei dem Stamm D-316 in den ersten 24 h bereits eine kontinu-

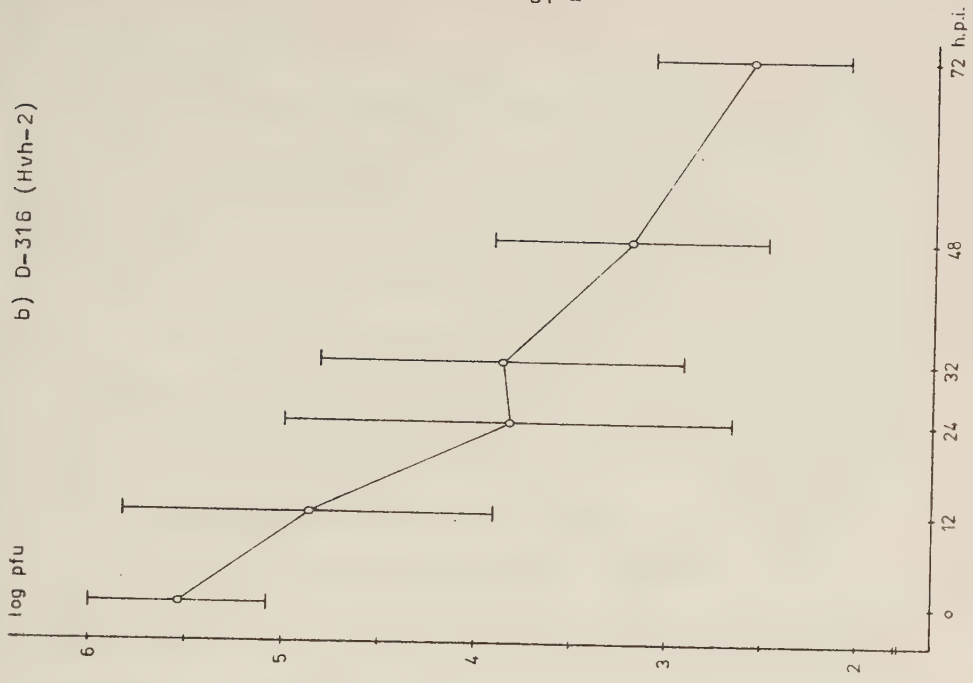
ierliche Titerreduktion finden.

Wir nehmen an, daß die Ursache für die stärkere und raschere Inaktivierung des Stammes D-316 in der allgemein bekannten (32, 40, 90, 106, 120, 121) höheren Temperaturlabilität der Typ-2-Stämme zu suchen ist.

maximale Inaktivierung von Hvh-Stämmen während Inkubation bei 37°C



b) D-316 (Hvh-2)



3.1.2. Das Vermehrungsverhalten der Herpesviren in Makrophagen

Um zu untersuchen, ob sich die Herpesviren in Kulturen von Mäuseperitonealmakrophagen *in vitro* vermehren, haben wir folgenden Versuchsaufbau verwandt:

Die Zellen wurden aus der Bauchhöhle von nicht vorbehandelten oder drei Tage vorher mit 2 ml TM i.p. stimulierten Mäusen durch Peritoneallavage gewonnen und in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ bei 37°C in Petrischalen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen mit Virus infiziert und nach 2 h gründlich gewaschen. Danach wurde die Inkubation fortgesetzt.

Vom Überstand der Kulturen wurde zu festen Zeiten nach der Infektion (3 h, 5 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h, 48 h und 72 h) 0,1 ml abgenommen und bei -70°C eingefroren. Nach Abschluß der Versuche haben wir alle Proben gemeinsam aufgetaut und auf primären Kaninchennierenzellen titriert.

Wir haben in unseren Untersuchungen die Vermehrbarkeit der Herpesviren in normalen und stimulierten Makrophagen von zwei Mäusestämmen, NMRI und C57bl, bei einigen Virusstämmen auch noch in normalen Balb-c- und CBA-Makrophagen miteinander verglichen. Es ist uns dabei nicht gelungen, in allen Versuchen eine annähernd gleiche Zellzahl in den verschiedenen Kulturen einzustellen; die Zellzahl schwankte etwa von 5×10^5 bis 1×10^6 pro Petrischale, wobei sich meistens etwa 7 bis 8×10^5 Zellen in einer Petrischale befanden. Dies lag einmal daran, daß sich die Makrophagen der verschiedenen Mäusestämme unter unseren Versuchsbedingungen unterschiedlich gut kultivieren ließen, zum anderen jedoch auch daran, daß die stimulierten Makrophagen die verschiedenen Waschprozeduren

mit weniger Verlust überstanden, da sie offenbar fester an die Unterlage adhäriert waren. Die Infektionsdosis wurde so hoch gewählt, daß das Virus-Zellverhältnis immer größer oder gleich 1 war.

Sowohl in den Kulturen der NMRI- als auch der C57-Mäuse wurde, etwa 8 h nach der Infektion beginnend, ein cytopathischer Effekt sichtbar. Die Zellen kugelten sich ab und lösten sich, zum Teil Klumpen bildend, von der Unterlage ab. Eindeutige Unterschiede in der Intensität des CPEs zwischen den Kulturen der NMRI- und der C57-Makrophagen konnten wir nicht nachweisen. Es ist möglich, daß wir mit unserer Infektionsdosis, ähnlich wie J. Lindenmann et al. (199) es bei dem Myxovirusstamm M-TUR für Makrophagenkulturen resistenter und susceptibler Mäusestämme beschrieben haben, in einem so hohen Bereich der Viruskonzentration lagen, daß diese auch auf die resistenten Makrophagen toxisch wirkte.

Die Tabellen 6.1 bis 6.7 (S. 167-181) zeigen den Verlauf der Virustiter im Überstand von Kulturen normaler und stimulierter Makrophagen der NMRI- und C57-Mäuse zu den angegebenen Zeiten nach der Infektion. Bei einigen Virusstämmen wurde auch die Vermehrbarkeit in normalen Balb-c- und CBA-Makrophagen geprüft. Aus allen Parallelversuchen für ein Virus wurde eine Mittelwertkurve berechnet. Die folgenden Abbildungen 3.2 bis 3.7 geben den Verlauf der Titer in einigen typischen Beispielen wieder.

Aus unseren Ergebnissen wird deutlich, daß einige Stämme des Hvh sich in Makrophagen vermehren können, wobei allerdings die Multiplikationsraten nur in einem Bereich von 0,5 bis 1,5

Zehnerpotenzen liegen.

Wir stellen weiter fest, daß sich die Herpesviren - erstens - in den NMRI-Makrophagen besser vermehren können als in den C57-Makrophagen, wobei nur das frische Isolat Eckert eine Ausnahme bildet, und daß - zweitens - die Hvh-Stämme in den stimulierten Makrophagen eine höhere Multiplikationsrate aufweisen als in den normalen.

Hinsichtlich ihrer Vermehrungspotenz in den Makrophagenkulturen lassen sich die getesteten Hvh-Stämme im Einzelnen folgendermaßen unterteilen (siehe Tabelle 3.1, S. 55).

Der Stamm Lennette (Hvh-1) vermehrt sich in normalen und noch besser in stimulierten NMRI-Makrophagen, zeigt jedoch keine Vermehrung in denen der C57-Mäuse, seien sie stimuliert oder normal. Auch in den normalen Makrophagen der Balb-c- und der CBA-Mäuse läßt sich eine leichte Vermehrung feststellen.

Tabelle 3.1

Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in normalen und stimulierten Makrophagen

	NMRI normal	NMRI stim.	C57 normal	C57 stim.	Balb-c normal	CBA normal
1) <u>Len (Hvh-1)</u> Vermehrung max. Titerans. Signifikanz	n = 6 + 24 h: 0.69 p < 0.001	n = 4 ++ 32 h: 1.45 p < 0.025	n = 10 -	n = 3 -	n = 8 + 24 h: 0.46 p < 0.125	n = 4 + 24 h: 0.44 keine
2) <u>L3-25 (Hvh-1)</u> Vermehrung max. Titerans. Signifikanz	n = 3 -	n = 5 + 24 h: 0.72 p < 0.125	n = 2 -	n = 3 -	n.d.	n.d.
3) <u>IES (Hvh-1)</u> Vermehrung max. Titerans. Signifikanz	n = 6 -	n = 5 + 24 h: 0.49 keine	n = 6 -	n = 3 -	n = 3 -	n = 3 -
4) <u>Isolat "Eckert"</u> <u>(Hvh-1)</u> Vermehrung max. Titerans. Signifikanz	n = 2 + 24 h: 0.48 keine	n = 3 ++ 32 h: 0.98 p < 0.05	n = 3 + 24 h: 0.48 keine	n = 2 ++ 24 h: 0.99 p < 0.025	n.d.	n.d.

Tabelle 3.1 - Fortsetzung

	NMRI normal	NMRI stim.	C57 normal	C57 stim.	Balb-c normal	CBA normal
5)ER (intermed.) Vermehrung max. Titeranst. Signifikanz	n = 5 -	n = 4 + 24 h: 0.83 p < 0.125	n = 2 -	n = 3 (+)	n.d.	n.d.
6)D-316 (Hvh-2) Vermehrung max. Titeranst. Signifikanz	n = 3 -	n = 7 + 24 h: 0.55 p < 0.125	n = 3 -	n = 3 -	n = 1 -	n = 1 -
7)D0 (Hvh-1) Vermehrung max. Titeranst. Signifikanz	n = 3 -	n = 3 (+)	n = 2 -	n = 3 -	n.d.	n.d.

Es bedeuten: - Titerabfall, keine Vermehrung
 (+) Titerkonstanz bis 48 h
 + Vermehrung, max. Titeranstieg bis 0.95
 ++ Vermehrung, max. Titeranstieg größer als 0.95
 n Zahl der Parallelversuche
 n.d. nicht durchgeführt

Der maximale Titeranstieg ergab sich als Differenz zwischen dem maximalen und dem 5-h-Wert.

Zwei weitere Hvh-1-Stämme, L3-2S und IES, und der intermediäre Stamm ER verhalten sich ähnlich. Sie zeigen zwar in normalen NMRI-Makrophagen keine Vermehrung, jedoch eine deutliche in stimulierten NMRI-Zellen. In normalen C57-Makrophagen findet bei allen drei Virusstämmen keine Virusmultiplikation statt, auch in den stimulierten C57-Makrophagen ist für die Hvh-1-Stämme L3-2S und IES keine Vermehrung meßbar, nur der Stamm ER zeigt eine Titerkonstanz bis zur 48-sten Stunde.

Die beiden Hvh-2-Stämme D-316 und DD zeigen in normalen NMRI- und in normalen und stimulierten C57-Makrophagen einen sehr steilen Titerabfall, der deutlich ausgeprägter ist als bei den Hvh-1-Viren. In den Kulturen mit stimulierten NMRI-Makrophagen finden sich dagegen für den Stamm D-316 eine leichte Vermehrung, wobei allerdings der Titer nach der 32-sten Stunde wiederum sehr steil abfällt, für den Stamm DD eine Titerkonstanz bis zur 48-sten Stunde. Wir interpretieren diese Befunde dahingehend, daß sich auch die genannten Hvh-2-Stämme zumindest in den stimulierten NMRI-Makrophagen vermehren können, daß jedoch die Inaktivierung durch thermische (vgl. Kap. 3.1.1.) und pH-Einflüsse* bei den Typ-2-Viren stärker ausgeprägt ist und bei der Messung des Virusgehaltes im Überstand die Virusmultiplikation überwiegt.

*Nach Angaben aus der Literatur (79) hat der Stamm D-316 ein sehr stark alkalisches pH-Optimum für seine Vermehrung in Kaninchennierenzellen, auf das unsere Kulturen nicht eingestellt waren.

Das frische Isolat "Eckert" (Hvh-1) ist der einzige Virusstamm, der sich auch in normalen C57-Makrophagen vermehrt. Wir nehmen an, daß die starke Vermehrungspotenz dieses Stammes in allen getesteten Makrophagenkulturen mit der Tatsache in Zusammenhang zu bringen ist, daß es sich hierbei um ein neu angezüchtetes Virus in der ersten und zweiten Zellpassage handelte.

Es wurde in unserem Labor (137) auch noch der Stamm Thea (Hvh-1) getestet, der in die gleiche Kategorie wie die Typ-1-Stämme IES und L3-2S zu gehören scheint. Er zeigt keine Vermehrung in normalen NMRI-Makrophagen, eine geringgradige in stimulierten NMRI-Makrophagen und keine Vermehrung in normalen und stimulierten C57-Zellen.

Abb. 3.2 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen, Lennette (Hvh-1)

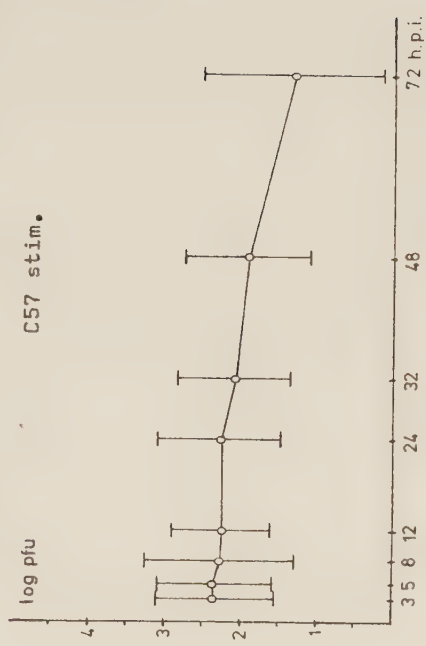
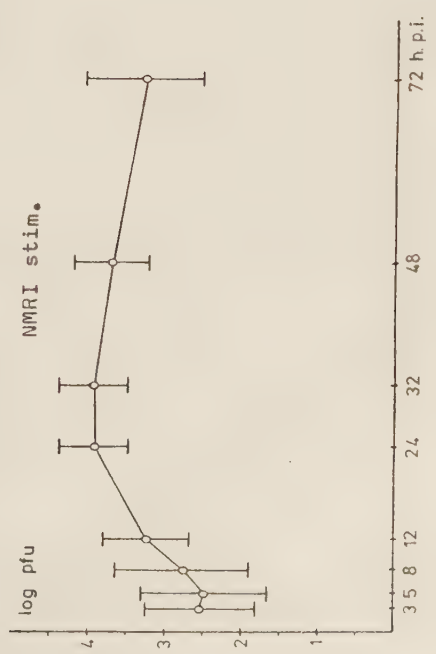
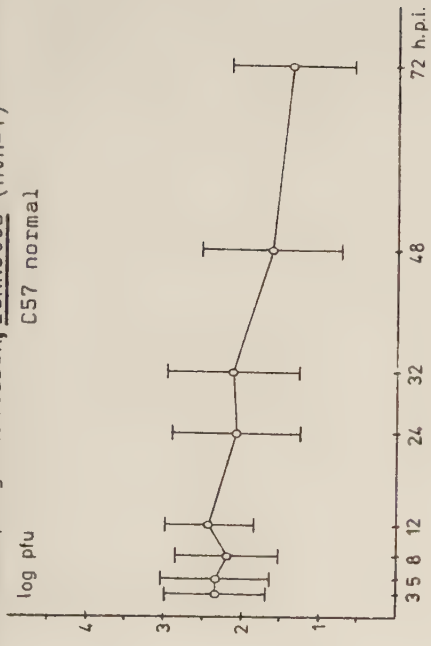
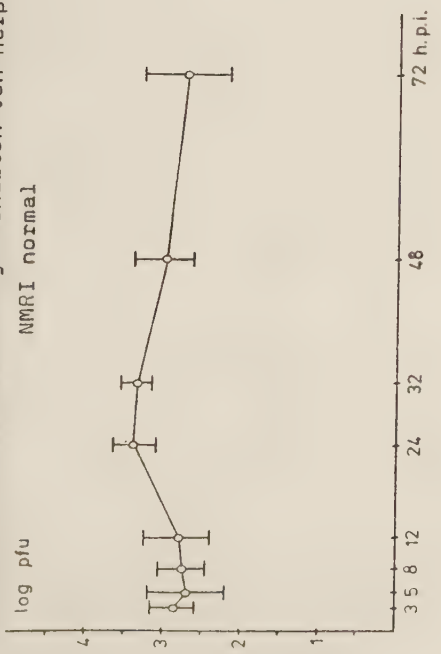


Abb. 3.3 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen, L3-2S (Hvh-1)

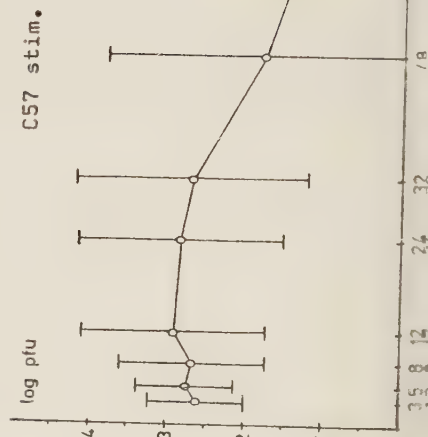
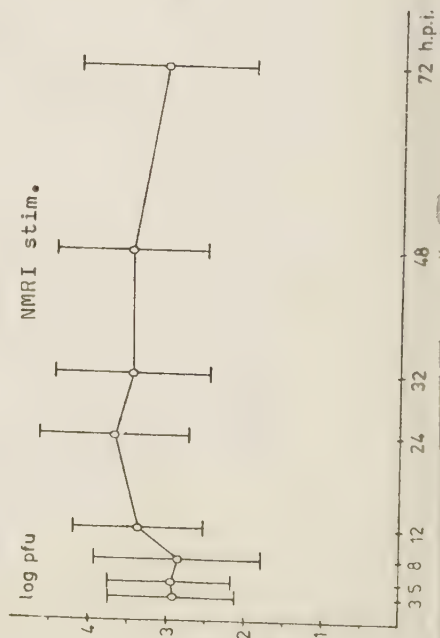
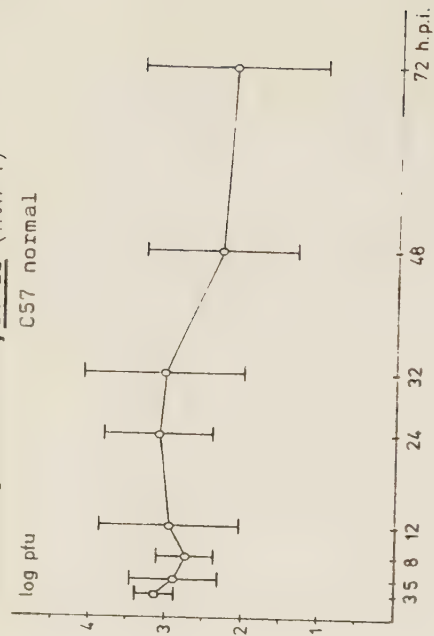
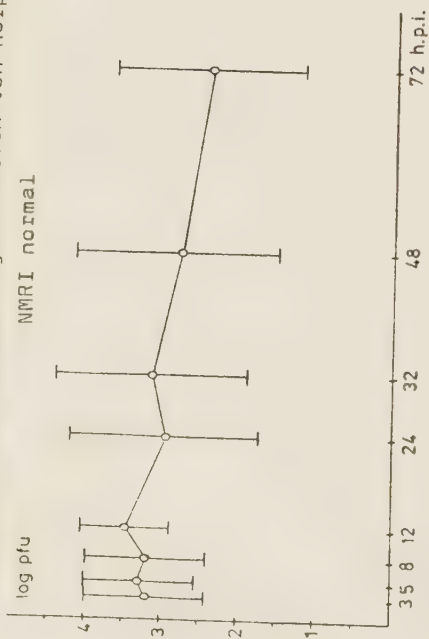
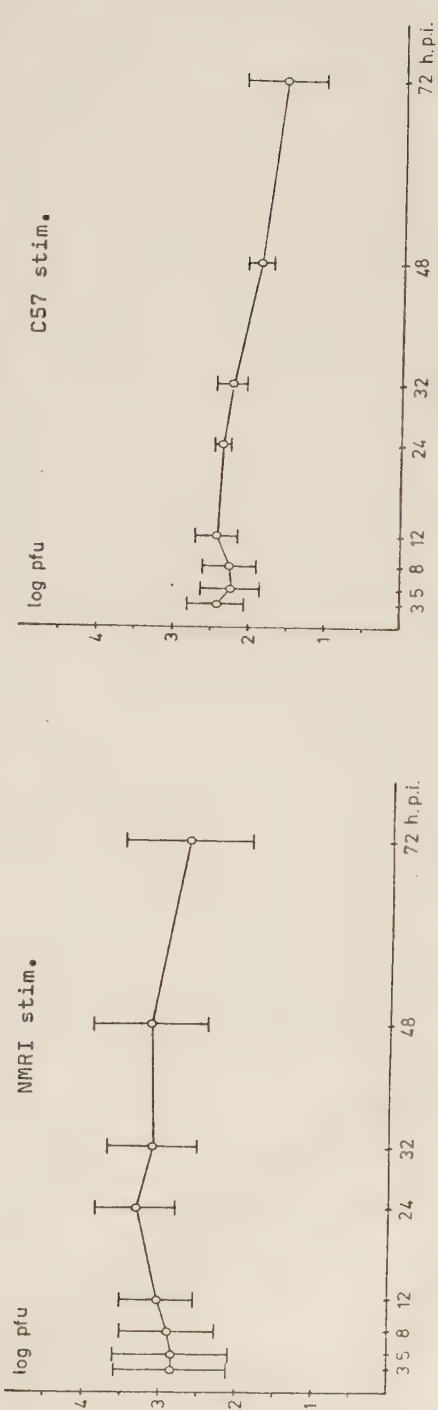
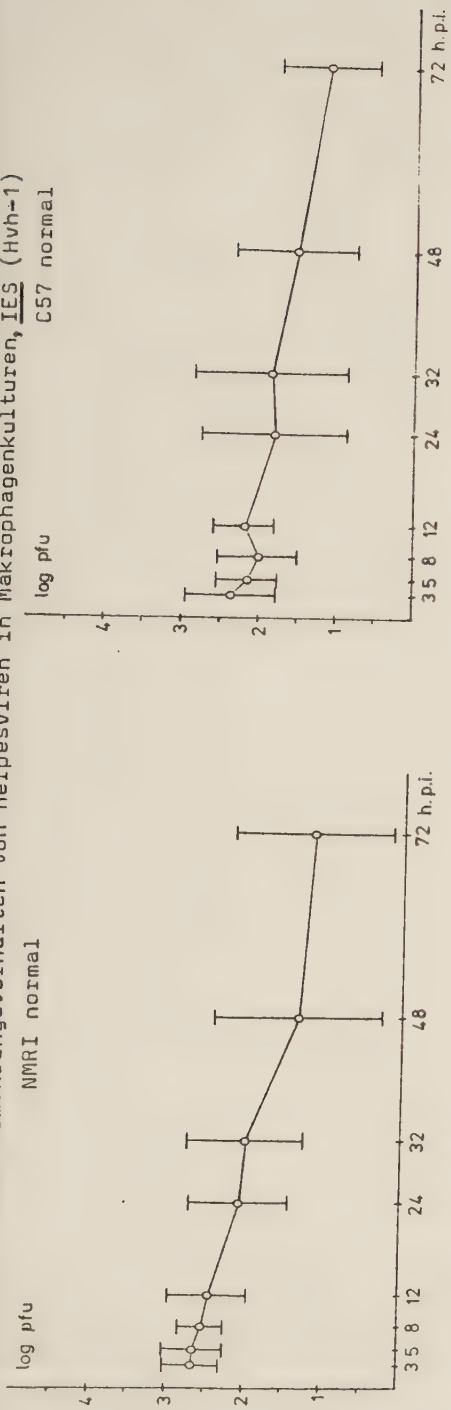


Abb. 3.4 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen, IES (Hvh-1)
 CS7 normal



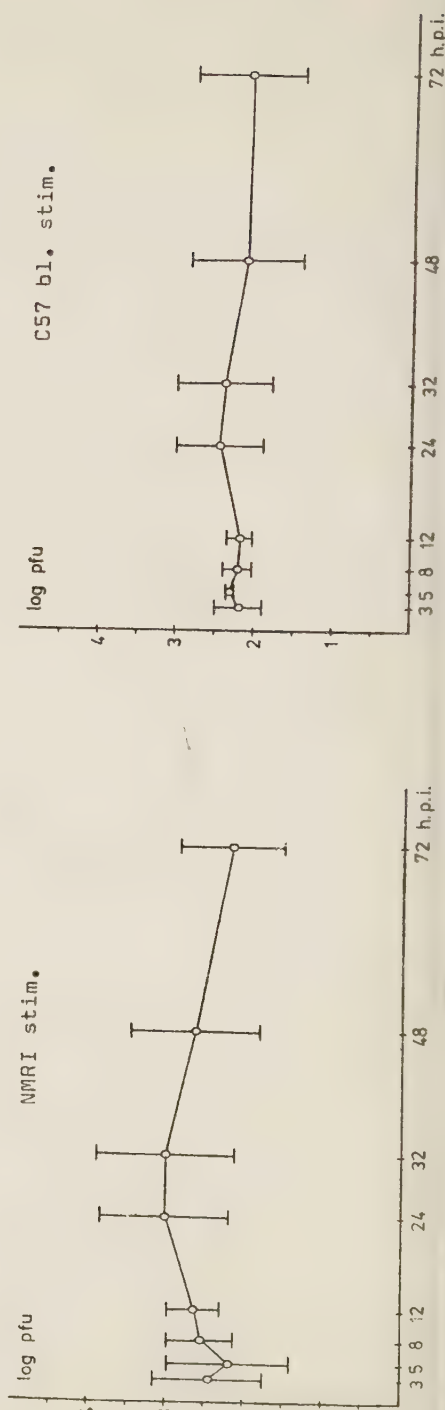
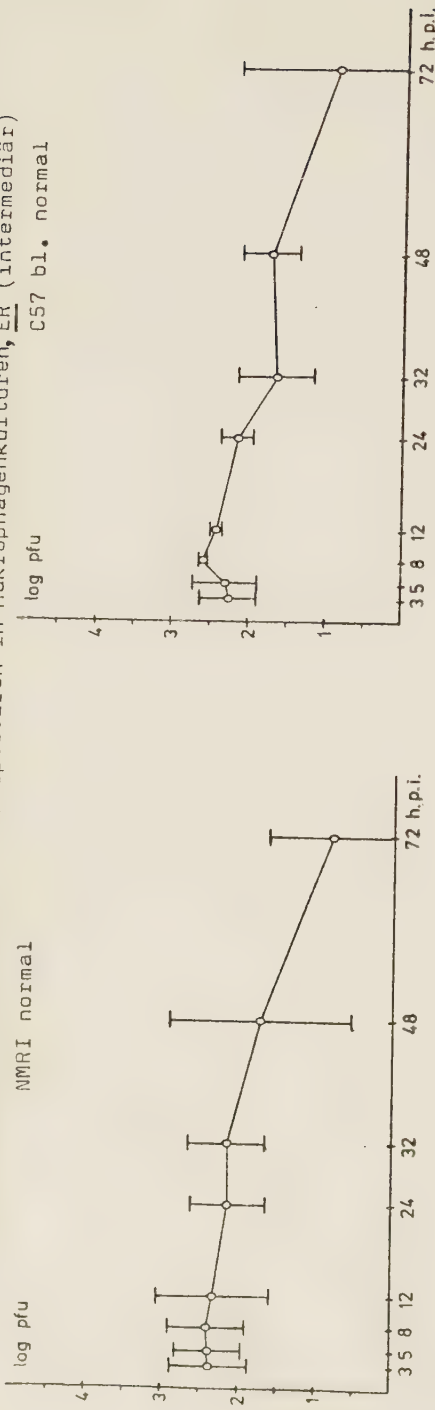
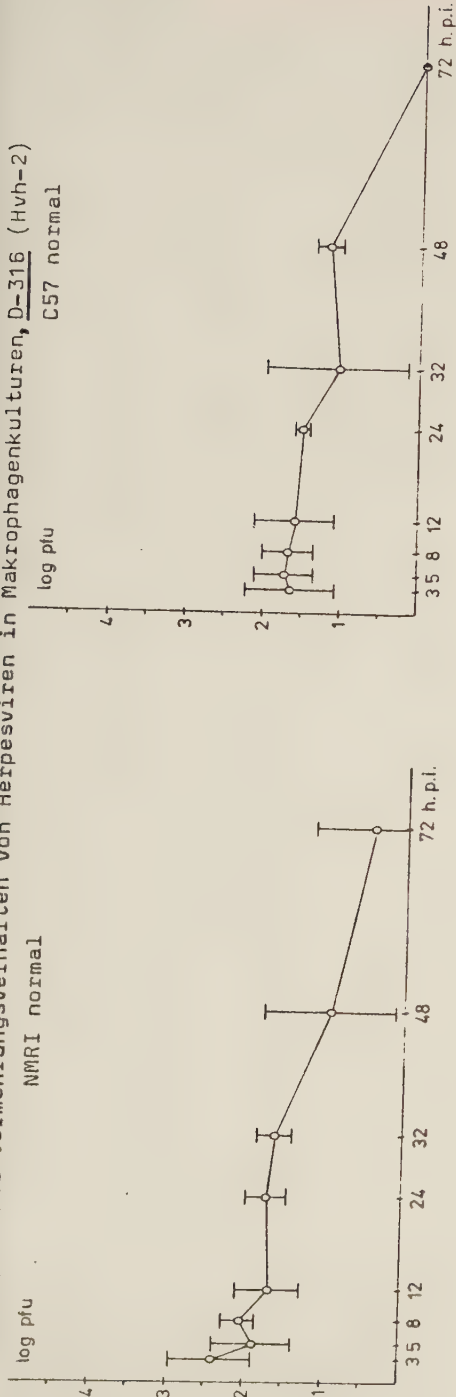
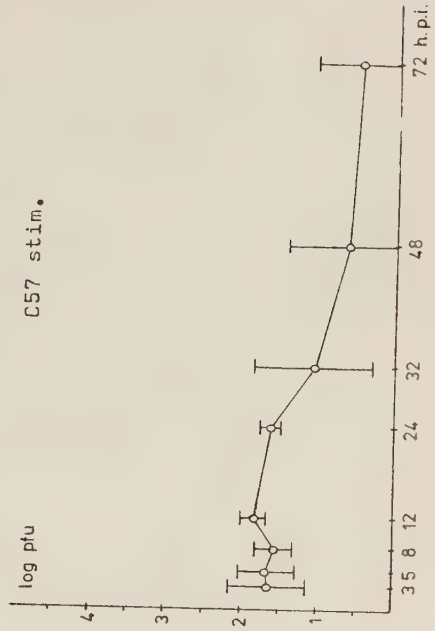


Abb. 3.6 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen, D-316 (Hvh-2)
 C57 normal



C57 stim.



NMRI stim.

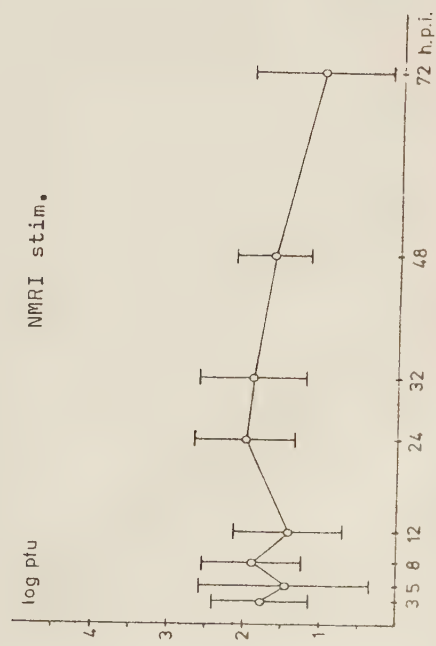
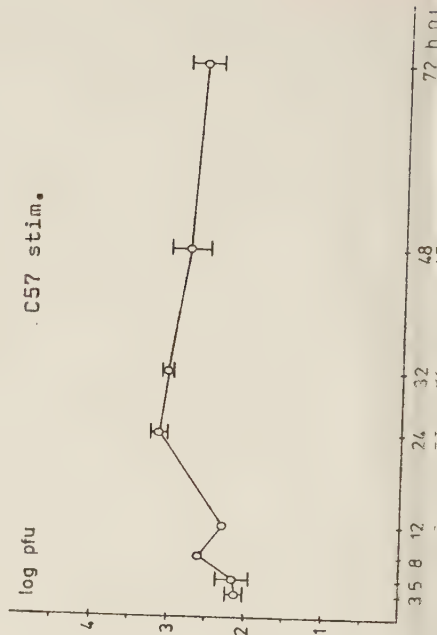
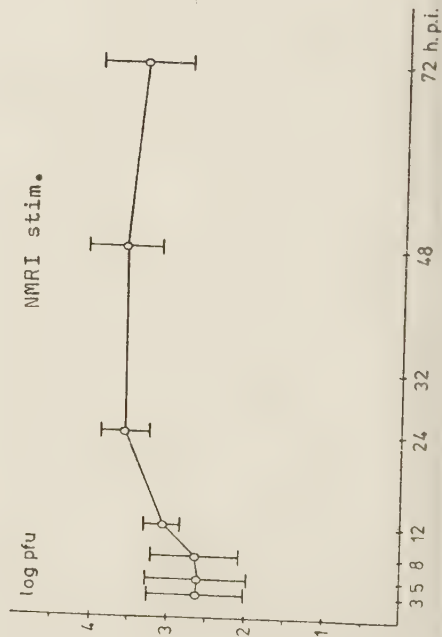
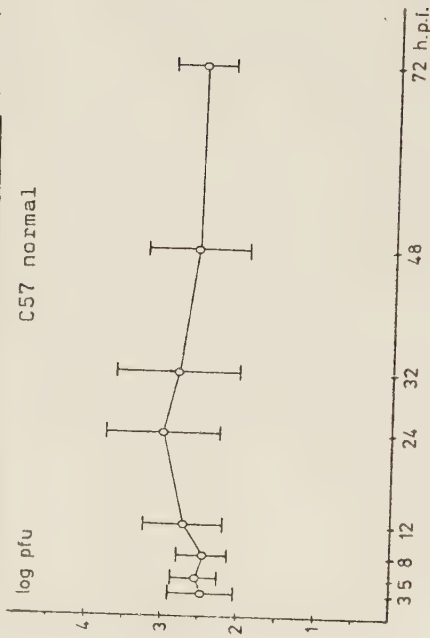
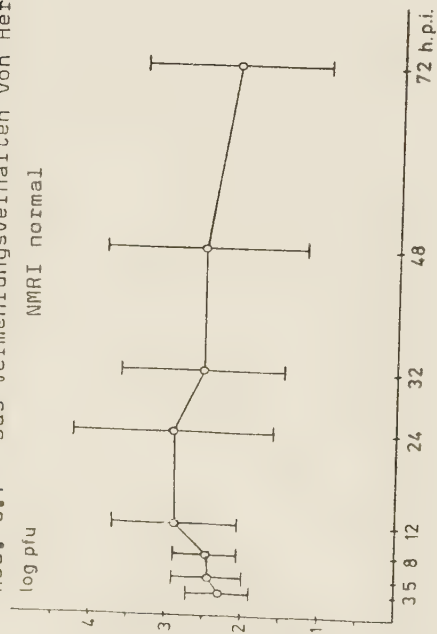


Abb. 3.7 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen, Isolat "Eckert" (Hvh-1)



3.1.3. Die Vermehrung der Herpesviren in embryonalen Fibroblastenkulturen von NMRI- und C67bl-Mäusen

Um zu ergründen, ob die in den Makrophagen der C57-Mäuse beobachtete fehlende bzw. geringere Vermehrungstendenz der Herpesviren Ausdruck einer geringeren Vermehrungsfähigkeit der Erreger in allen somatischen Zellen dieses Mäusestammes ist, haben wir das Verhalten der bereits in 3.1.2. verwandten Hvh-Stämme in embryonalen Fibroblastenkulturen von NMRI- und C57-Mäusen untersucht.

Wie die Tabellen 6.8 bis 6.13 (S. 182-187) für die einzelnen Viren und die zusammenfassende Darstellung in Tabelle 3.2 (S. 59) zeigen, vermehren sich die Herpesviren in den Fibroblasten beider Stämme bei einem Virus-zu-Zellverhältnis, das wesentlich unter dem in den Makrophagenkulturen angesetzten liegt, auf durchschnittlich das Hundertfache des Ausgangswertes (Siehe auch Abb. 3.8 und 3.9).

Bis auf den Stamm Lennette, bei dem wahrscheinlich zu hohe Ausgangswerte durch schlechte Abwaschbarkeit des Inokulums den Verlauf in den NMRI-Fibroblastenkulturen verfälschen und dem Stamm IES, bei dem wir eine nahezu gleich große Multiplikationsrate in beiden Fibroblastenarten finden, ist die Vermehrung in den Fibroblasten der NMRI-Mäuse 4 bis 5 mal stärker als in denen der C57-Mäuse. Wir sollten uns aber an dieser Stelle vor Augen halten, daß die Genauigkeit unseres Meßsystems nicht sehr groß ist, und daß daher diesem Tatbestand nicht zu viel Bedeutung zugemessen werden kann. Außerdem ist es möglich, daß die etwas geringere Multiplikationsrate, wie wir sie in den C57-Fibroblasten beobachtet haben,

dadurch zu erklären ist, daß die C57-Kulturen durchschnittlich um ein bis zwei Tage älter waren als die NMRI-Fibroblasten.

Wie auch bei den Makrophagenversuchen (Siehe Kap. 3.1.2.) stellen wir fest, daß die Multiplikationsraten unserer getesteten Typ-2-Stämme im Durchschnitt etwas niedriger liegen als die der Hvh-1-Viren. Dieser Befund ist wahrscheinlich zum einen die Folge einer tatsächlich geringeren Multiplikationsrate der Typ-2-Viren in den Fibroblasten, zum anderen aber auch der verminderten Empfindlichkeit unseres Referenzellsystems, der Kaninchennierenzellen.

Tabelle 3.2 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in embryonalen Mäusefibroblasten (Zusammenfassung)

	NMRI	C57
1) Lennette (Hvh-1) max. Titeranstieg* Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 5 32 h: 1.94 $p < 0.05$ 3,8 d	n = 6 32 h: 2.22 $p < 0.0005$ 5,3 d
2) L3-2S (Hvh-1) max. Titeranstieg Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 2 48 h: 2.72 $p < 0.05$ 4,5 d	n = 3 32 h: 2.00 $p < 0.001$ 4,8 d
3) IES (Hvh-1) max. Titeranstieg Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 5 48 h: 2.19 $p < 0.0001$ 4,0 d	n = 5 32 h: 2.26 $p < 0.0005$ 5,4 d
4) ER (intermediär) max. Titeranstieg Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 3 32 h: 2.37 $p < 0.005$ 4,0 d	n = 4 32 h: 1.28 $p < 0.005$ 6,0 d
5) D-316 (Hvh-2) max. Titeranstieg Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 3 24 h: 2.28 $p < 0.001$ 4,0 d	n = 6 32 h: 1.79 $p < 0.0005$ 5,3 d
6) DD (Hvh-2) max. Titeranstieg Signifikanz durchschnittl. Kulturalter	n = 3 24 h: 2.13 $p < 0.0005$ 4,0 d	n = 4 48 h: 1.78 $p < 0.005$ 6,0 d

n = Anzahl der Parallelversuche

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

* = max. Titeranstieg, immer auf 5-h-Wert bezogen.

Abb. 3.8 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in embryonalen Fibroblastenkulturen, L3-2S (Hvh-1)

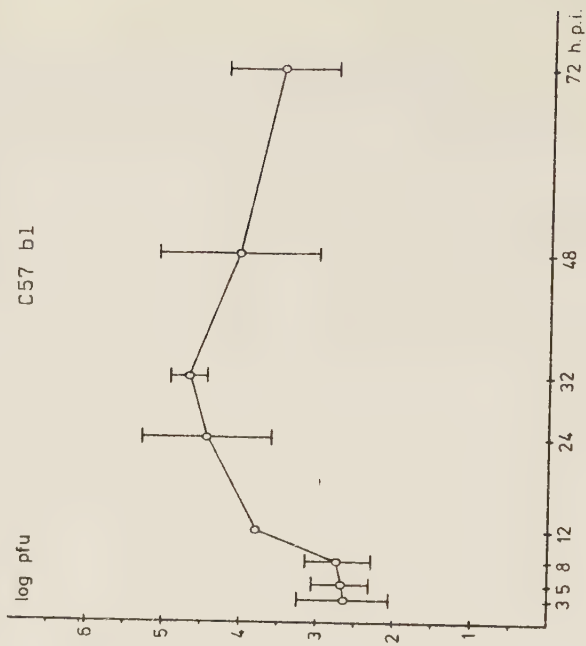
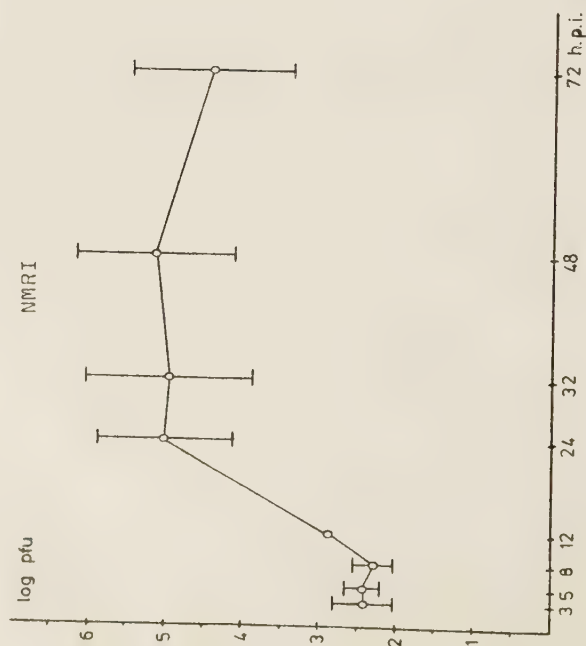
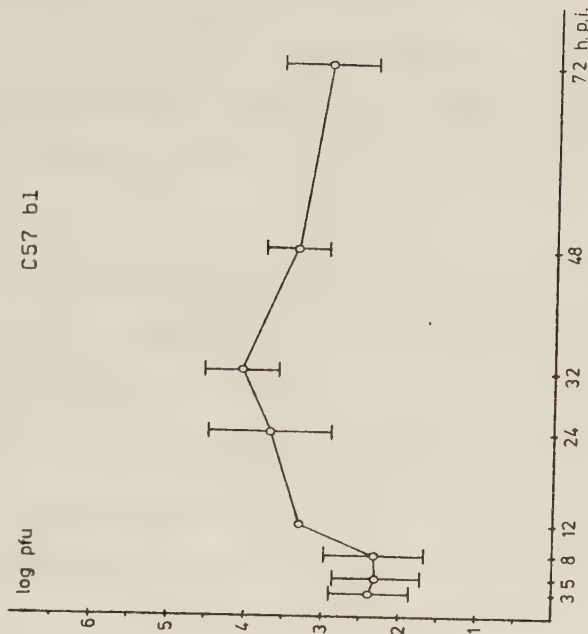
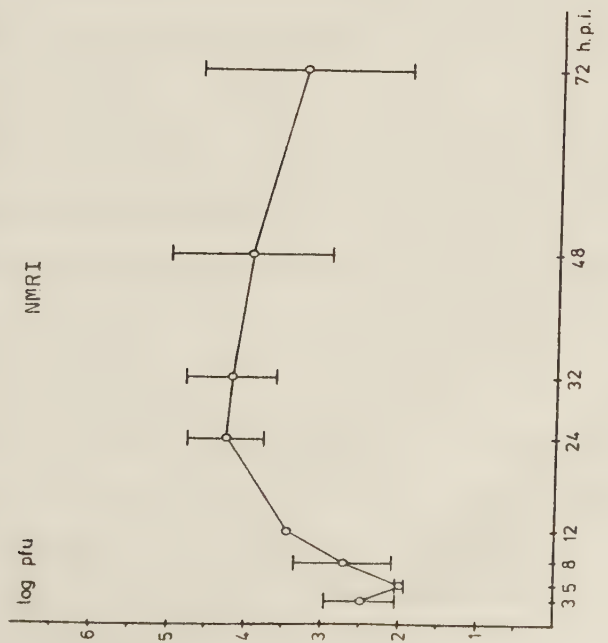


Abb. 3.9 Das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in embryonalen Fibroblastenkulturen, D-316 (Hvh-2)



3.2. In-vivo-Untersuchungen

3.2.1. Das klinische Erscheinungsbild bei der intraperitonealen Infektion mit den Hvh-Stämmen Len (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2)

Bei der Infektion mit dem Stamm Len (Hvh-1) werden die ersten Krankheitszeichen mit einer Schwäche der Hinterläufe am vierten bis fünften Tag sichtbar. Die Schwäche entwickelt sich in den folgenden Tagen zu einer vollständigen schlaffen Parese der hinteren Extremität, zu der meist eine Blasenlähmung hinzutritt. Im weiteren Verlauf wird der untere Teil des Rumpfes in die Lähmung miteinbezogen, die Vorderbeine und der Kopf bleiben jedoch in der Regel verschont.

Ein Teil der Tiere stirbt an Allgemeinerscheinungen des Krankheitsprozesses wie Harnwegsinfektionen und wahrscheinlich auch Pneumonien, außerdem an Mangelernährung, da die Tiere Nahrung und Wasser aufgrund der Lähmung ihrer Hinterläufe nicht mehr erreichen. Bis ins Finalstadium hinein machen die Tiere jedoch einen bewußtseinsklaren Eindruck; enzephalitische Zeichen werden selten beobachtet. Ein größerer Teil der Tiere erholt sich unter Zurückbildung der Lähmungen.

Im Gegensatz dazu fallen die mit dem Stamm D-316 (Hvh-2) infizierten Tiere anfangs (4. bis 5. d.p.i.) durch eine starke Exzitiertheit auf. Die Paresen in den Hinterläufen sind nur angedeutet. Ab dem sechsten bis siebten Tag p.i. werden die Tiere somnolent, sie haben ein gesträubtes Fell und zeigen auffällig starke Flankenatmung, die final in eine hörbare Schnappatmung übergeht. ~~Nahzu~~ alle Tiere, die das Stadium der Somnolenz erreicht haben, sterben in den nächsten ein bis vier

Tagen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei den mit dem Stamm Len infizierten Tieren der Verlauf der Infektion durch eine ascendierende Myelitis charakterisiert ist, während bei den mit dem Stamm D-316 infizierten Tieren die Meningoenzephalitis im Vordergrund steht, die allerdings zwei bis drei Tage später einsetzt als die ersten Krankheitszeichen bei der Infektion mit dem Hvh-1-Stamm.

Diese Angaben beziehen sich auf das Erscheinungsbild der Infektion in vier bis fünf Wochen alten NMRI-Mäusen, die wir - wenn nichts anderes angegeben wird - auch in allen anderen Versuchen verwandt haben.

3.2.2. Untersuchungen zum Einfluß des TM auf die Pathogenese der i.p. Herpesinfektion

3.2.2.1. Applizierte Virusdosen

Um die Effekte des Thioglycollat-Medium (TM) auf die Herpesinfektion zu untersuchen, haben wir eine Infektionsdosis angestrebt, bei der durchschnittlich die Hälfte aller Tiere in einer Versuchsgruppe sterben, also die LD 50.

Wir haben die LD 50 nicht mehr selbst ermittelt, sondern uns auf Erfahrungswerte aus unserem Labor (41) gestützt. Diese lagen für den Stamm Len bei $2-5 \times 10^5$ pfu/Tier und für den Stamm D-316 bei 2×10^3 pfu/Tier.

Der Stamm Len scheint im Verlauf seiner zahlreichen Passagen in primären Kaninchennierenzellen an Tierpathogenität abgenommen zu haben (41). So genügten in späteren Versuchen

auch 5×10^5 pfu/Tier nicht, um die Hälfte der Tiere zu töten, es erkrankten in den Viruskontrollen jedoch immer mehr als 50 % der Mäuse mit deutlich sichtbaren Lähmungen.

3.2.2.2. Zeitkinetik für TM

Um herauszufinden, in welcher Zeitspanne zwischen der Applikation der Substanz und der Infektion mit den beiden Virusstämmen Len und D-316 das TM einen Einfluß auf die Infektion ausübt, haben wir den Mäusen zu verschiedenen Zeiten vor und nach der Infektion 2 ml TM i.p. injiziert und die Mortalität in den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet. Die Mortalitätsraten in den einzelnen Versuchsgruppen zeigt die folgende Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3 Zeitkinetik für TM

TM	Len		D-316	
	absolut	%	absolut	%
72 h a.i.	6/42 *	14,3	8/11	72,7
48 h a.i.	6/21	28,6	6/9	66,7
24 h a.i.	13/20	65,9	10/10 _x	100,0
8 h a.i.	9/11	81,8	n.d.	
3 h a.i.	32/43	74,4	6/11	54,5
12 h a.i.	4/11	36,4	n.d.	
24 h a.i.	17/31	54,8	23/31	74,3
Vi-Kontr.	18/42	42,9	21/30	70,0

* Anzahl der toten Tiere nach 21 Tagen / Gesamtzahl in der Versuchsgruppe.

x atypisches Aussehen, interkurrente Infektion wahrscheinlich.

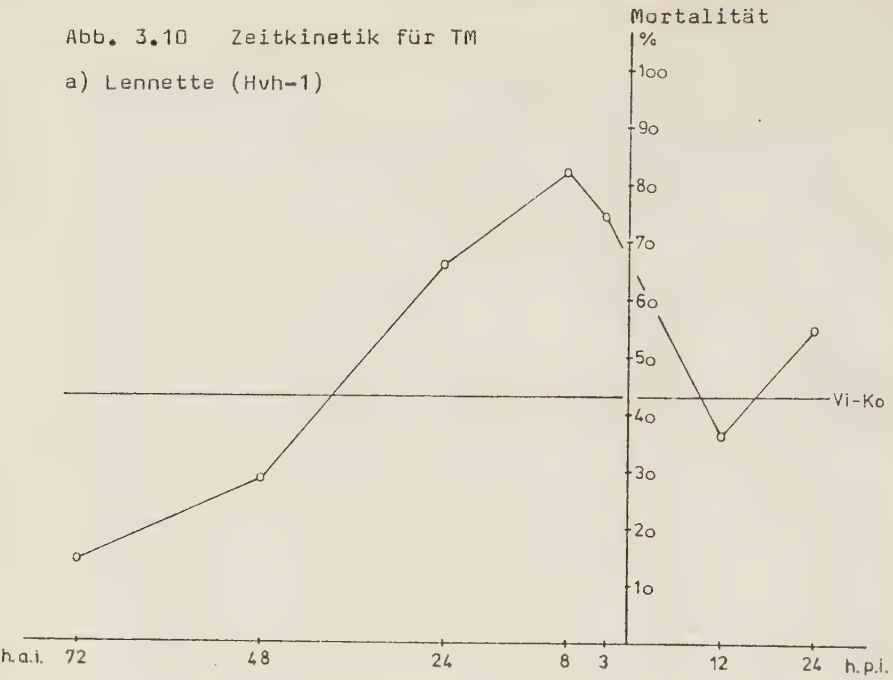
Wegen der geringen Anzahl von Versuchstieren, besonders in den Gruppen, die mit dem Stamm D-316 infiziert wurden, sind die sich ergebenden Prozentzahlen mit Vorsicht zu bewerten.

Dennoch zeigt es sich (siehe Abb. 3.10), daß das TM offenbar eine zweiphasige Wirkung hat, nämlich eine bei Applikation 72-48 h a.i. und eine bei Applikation 3-8 h a.i. .

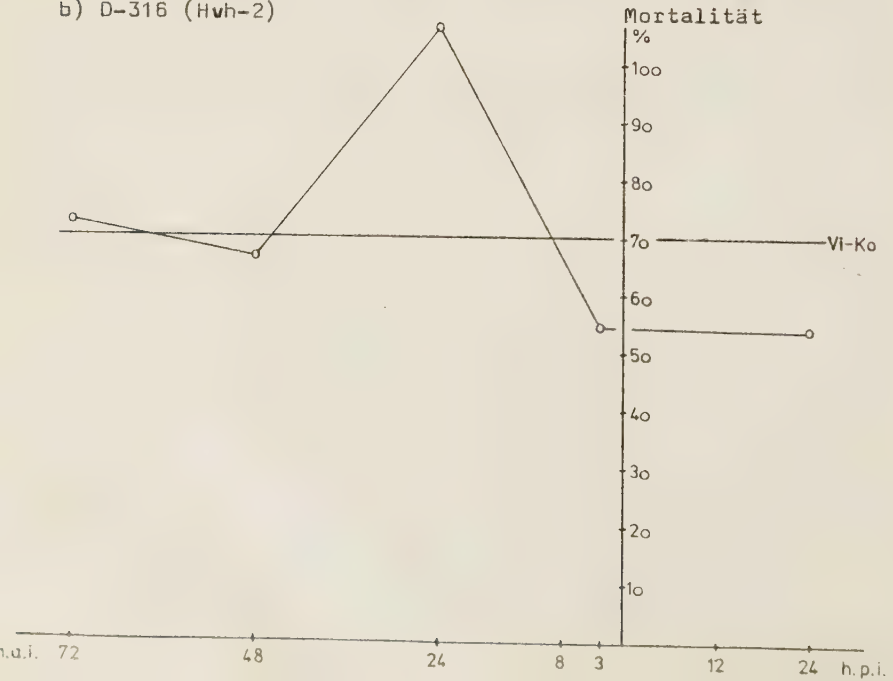
Wir können demnach einen Kurzzeit- und einen Langzeit-

Abb. 3.10 Zeitkinetik für TM

a) Lennette (Hvh-1)



b) D-316 (Hvh-2)



effekt voneinander unterscheiden, die die Infektion offenbar entgegengesetzt beeinflussen.

Nur bei der Gabe von TM 48 bis 72 h a.i. ist mit dem Vorliegen einer Population von stimulierten Makrophagen zu rechnen. Für den Kurzzeiteffekt müssen andere Faktoren verantwortlich sein.

Bei der Applikation von TM 12 und 24 h p.i. traten keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Viruskontrolle auf. Daher haben wir uns in den folgenden Untersuchungen darauf beschränkt, die Effekte des TM 3 h und 72 h vor der Infektion zu untersuchen.

3.2.2.3. Dosis-Wirkungsbeziehung für TM bei einer Infektion mit dem Stamm Len (Hvh-1)

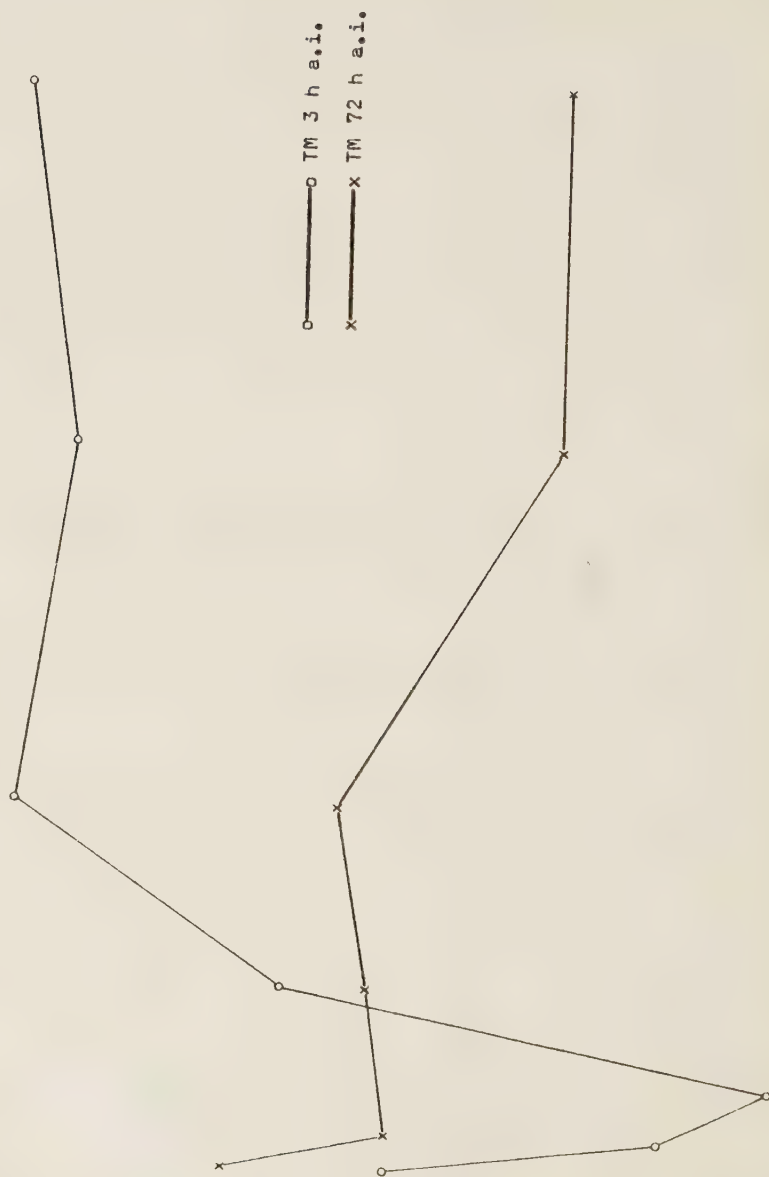
Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, ob der Effekt des TM eine Dosisabhängigkeit zeigt.

Tabelle 3.4 Dosis-Wirkungsbeziehung für TM (Mortalität)

TM-Dosis	TM 3 h a.i.		TM 72 h a.i.	
	absolut	%	absolut	%
0.0 ml (=Vi-Kontr.)	8/20	40	11/20	55
0.10 ml	3/20	15	8/20	40
0.25 ml	1/20	5	n.d.	-
0.50 ml	10/20	50	8/19	42
1.00 ml	15/20	75	9/20	45
2.00 ml	14/20	70	5/20	25
3.00 ml	15/20	75	5/20	25

Abb. 3.11. Dosis-Wirkungsbeziehung für TM

Mortalität (%)



Wie Tabelle 3.4 und Abb. 3.11 zeigen, trifft diese Vermutung zu. Ein definierter mathematischer Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und der Mortalitätsrate ist jedoch aus unseren Ergebnissen nicht ablesbar.

Wir wissen nicht, ob die Umkehrung des Effektes, wie wir sie bei der Applikation von 0.1 und 0.25 ml des TM 3 h a.i. beobachten, auf Zufälligkeiten zurückzuführen ist oder ob ihr andere Ursachen zugrundeliegen, da wir die Versuche mit so kleinen Mengen der Substanz nicht mehr weiter durchgeführt haben.

Für die weiteren Untersuchungen haben wir in Anlehnung an andere Autoren (34, 83), die eine Stimulation der PEC mit TM vornahmen, eine Dosierung von 2 ml TM / Maus gewählt. Aufgrund der Werte in Tabelle 3.4, aber auch aus praktischen Gründen (zu hohe Volumenbelastung im Peritoneum der Mäuse) haben wir die Dosis nicht auf 3 ml erhöht. Nach den Ergebnissen von Lin (83) befinden wir uns auch bei einer Dosis von 2 ml noch im Bereich der maximalen Stimulation, da eine dosisabhängige Steigerung dieses Effektes nur bis zu einem Inoculum von 1,6 ml auftritt, um dann konstant zu bleiben.

3.2.2.4. Der Einfluß von TM 72 h a.i. und 3 h a.i. auf die Infektion mit Len (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2)

Um die Wirkung des TM 72 h und 3 h a.i. auf die Pathogenese der Herpesinfektion näher zu untersuchen, haben wir in jeweils drei Parallelversuchen die Mortalität und Morbidität der Mäuse in den folgenden drei Gruppen

1. Virus-Kontrolle

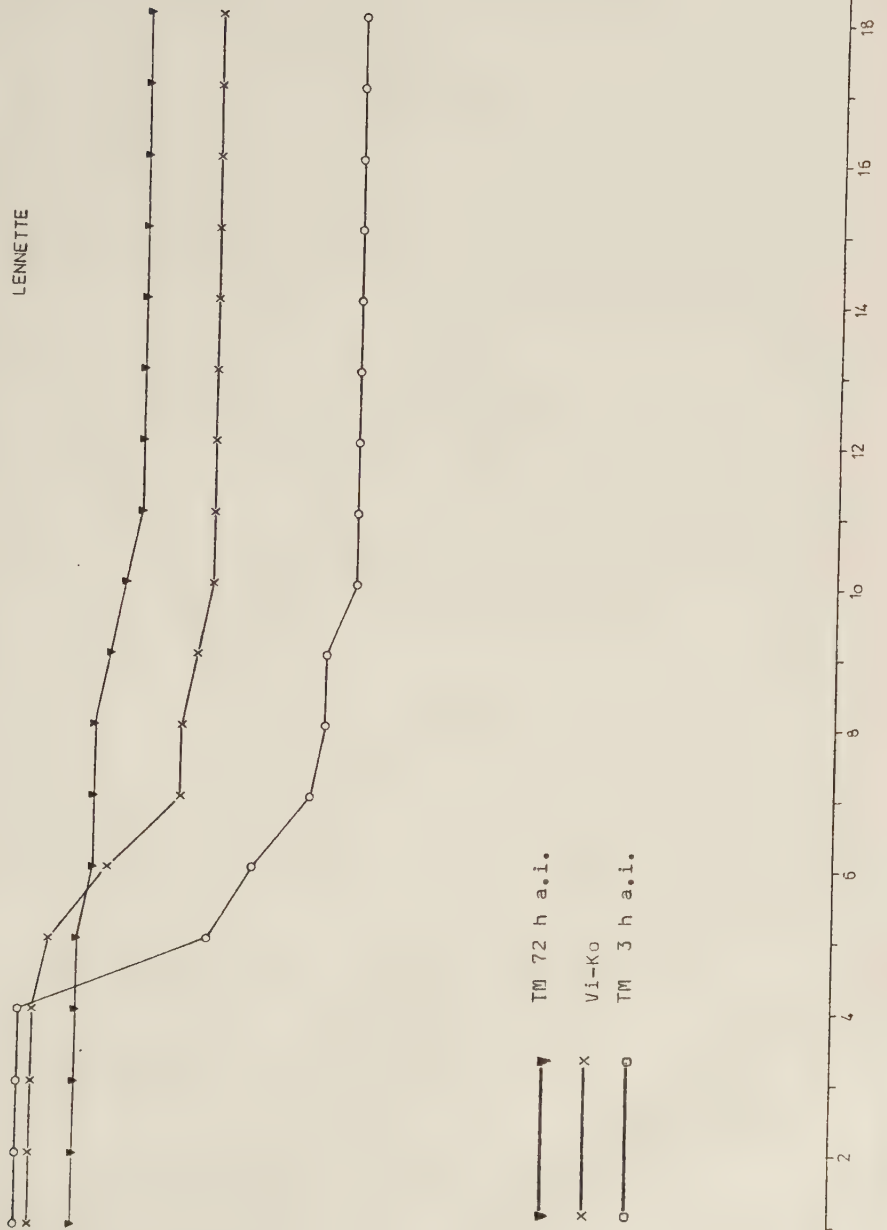
2. TM 72 h a.i. + Virus

3. TM 3 h a.i. + Virus

miteinander verglichen. Alle drei Parallelversuche erbrachten mit annähernd gleichen Infektionsdosen (Len (Hvh-1) 3×10^5 , 1×10^5 , 5×10^5 pfu/Tier; D-316 (Hvh-2) 2×10^3 , 2×10^3 , 2×10^3 pfu/Tier) jeweils gleichsinnige Veränderungen, so daß es erlaubt scheint, die Ergebnisse zu einer Gesamtdarstellung zusammenzufassen.

Wie die folgenden Abb. 3.12 und 3.13 und die Tabellen 6.15 und 6.16 (S.189-190) zeigen, führt das TM für den Stamm Len bei Gabe 72 h a.i. zu einer Erniedrigung, bei Gabe 3 h a.i. zu einer Steigerung der Pathogenität. Bei der Infektion mit dem Stamm D-316 treten genau gegensinnige Veränderungen auf, nämlich eine Erhöhung der Pathogenität bei Gabe des TM 72 h a.i. und eine Abnahme bei Gabe von TM 3 h a.i..

Alle gefundenen Effekte sind nach dem Vierfeldertest nach Yates (207) mit Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen 0.1 und 5 % statistisch signifikant.



leb. Tiere

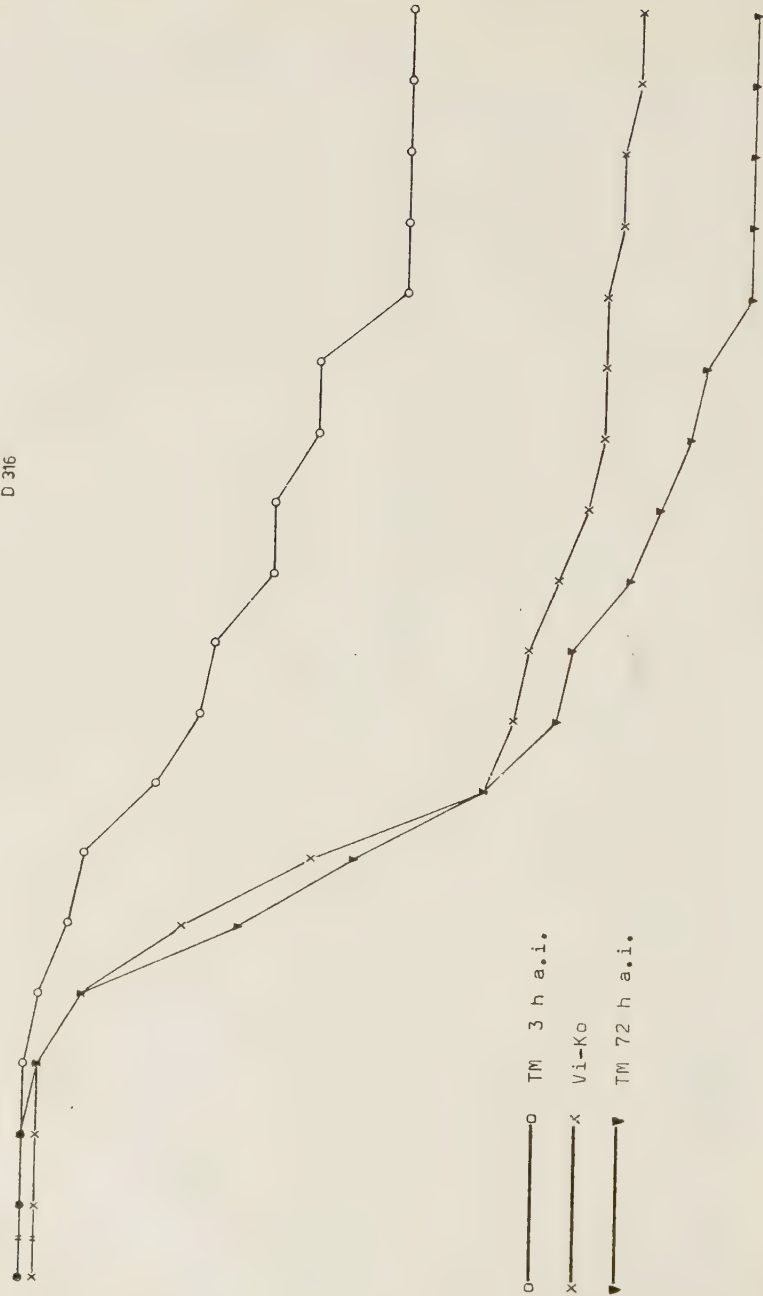
Abb. 3.13. Der Einfluß des TM auf die i.p. Herpesinfektion

D 316

- 80 -

○ — TM 3 h a.i.
 x — Vi-Ko
 ▼ — TM 72 h a.i.

1 4 6 8 10 12 14 16 18 20 TAGE p.i.



3.2.2.5. Der Einfluß des TM auf die i.p.-Infektion mit anderen Stämmen des Hvh

Wir haben uns nun gefragt, ob die unterschiedliche Beeinflussung der Pathogenese der Herpesinfektion durch TM, wie wir sie für die Stämme Len und D-316 gefunden haben, eine für den jeweiligen Stamm spezifische Eigenschaft ist oder ob die beiden Stämme als Repräsentanten des jeweiligen Serotyps gelten können.

Es wurden daher noch zwei weitere Viren getestet, nämlich der Stamm L3-2S (Hvh-1) und der Stamm DD (Hvh-2).

Tabelle 3.5 Der Einfluß des TM auf die Infektion mit dem Stamm L3-2S

	Mortalität	
	abs.	rel.
Virus-Kontrolle	10/39 ⁺	25,6 %
TM 72 h a.i.	6/37	16,2 %
TM 3 h a.i.	16/30	53,3 %

⁺ Anzahl der toten Tiere / Gesamtzahl der Mäuse in der Versuchsgruppe

(alle Angaben beziehen sich auf den 12ten d.p.i.).

Wie die Tabelle 3.5 zeigt, ergeben sich für den Stamm L3-2S (Hvh-1) nach der Vorbehandlung mit TM dieselben Trends wie bei dem Stamm Len (Hvh-1), nämlich eine Abnahme der Mortalität bei Gabe des TM 72 h a.i. und eine Steigerung bei Gabe 3 h a.i.. Wegen der geringen Pathogenität des Stammes (die LD 50 war erheblich größer als die maximal mögliche Infektionsdosis) ist es uns bei der geringen Anzahl von Versuchstieren jedoch nicht gelungen, signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Bei dem Stamm DD handelt es sich dagegen um ein Hvh-2-Virus von sehr hoher Pathogenität. Selbst nach 1000-facher Verdünnung des Viruspools - dies entspricht einer Infektionsdosis von 1×10^2 pfu/Tier - waren am Ende der Beobachtungszeit in allen drei Gruppen 100 % der Tiere verstorben. Am neunten (Versuch a) bzw. elften (Versuch b) Tag ergaben sich folgende maximalen Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen:

Tabelle 3.6 Der Einfluß des TM auf die Infektion mit dem Stamm DD

Infekt. dosis	Versuch a		Versuch b	
	1×10^3 pfu/Tier		1×10^2 pfu/Tier	
	Mortalität		Mortalität	
	abs.	rel.	abs.	rel.
Virus-Kontr.	15/19 ⁺	80 %	12/19	63 %
TM 72 h a.i.	15/18	83 %	18/20	90 %
TM 3 h a.i.	12/19	63 %	8/20	40 %

⁺ Anzahl der toten Tiere/ Gesamtzahl in der Versuchsgruppe.

Leider sind auch diese Ergebnisse nicht signifikant, sie gehen jedoch in ihrem Trend parallel zu unseren Befunden mit dem Stamm D-316 dahingehend, daß wiederum bei Gabe des TM 72 h a.i. eine Verstärkung, bei Gabe 3 h a.i. hingegen eine Abschwächung der Pathogenität erkennbar wird. Eine weitere Testung der Viren in unserem Labor (19) hat die beschriebenen Trends für L3-2S und DD bestätigt.

Nach der Prüfung dieser beiden Stämme hatten wir die Vermutung, daß es sich bei der Beeinflussung der Pathogenese der Herpesinfektion durch TM um eine typenspezifische biologische Markereigenschaft handeln könnte. Zur Zeit sind noch Untersuchungen im Gange, in denen weitere Hvh-Stämme auf ihr Verhalten bei TM-Vorbehandlung untersucht werden sollen (19). Dabei wurde auch ein Hvh-1-Stamm (Thea) beobachtet, der sich gegenüber dem TM eher wie der Stamm D-316 (Hvh-2) verhält. Demnach ist die Hypothese einer strikten Typenspezifität des TM-Effektes nicht länger aufrechtzuerhalten.

3.2.2.6. Die Wirkung des TM auf den Virusgehalt in den Organen

Es sollte nun geklärt werden, ob die unterschiedliche Mortalität und Morbidität in den Versuchsgruppen unter der Vorbehandlung mit TM sich auch im Virusgehalt der einzelnen Organe widerspiegelt.

Wir haben daher je eine Gruppe von Mäusen mit TM 3 und 72 h a.i. vorbehandelt und diese Tiere samt einer Virus-Kontrollgruppe mit Virus infiziert. An jedem der darauffolgenden Tage wurden zwei Tiere pro Gruppe getötet und unter sterilen

Bedingungen Leber, Milz, Rückenmark, Gehirn und Thymus entnommen und bei -70°C eingefroren. Nach Abschluß aller Organentnahmen haben wir die Proben aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:10 mit Medium verdünnt. Anschließend wurden sie homogenisiert, ultrabeschallt, zentrifugiert und in Zehnerschritten auf primären Kaninchennierenzellen titriert.

Da der Überstand der Organsuspensionen von Leber, Milz und Thymus toxisch auf den Zellrasen wirkte, war es nicht möglich, die Plaques einzeln auszuzählen. Wir haben uns daher darauf beschränkt, in den Verdünnungsreihen zwischen viruspositiven und -negativen Röhrchen zu unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen die Tabellen 6.17 und 6.18 a-e (S. 191-194) und die Abbildungen auf den folgenden Seiten. Dabei entsprechen die eingetragenen Werte dem Logarithmus der größten noch viruspositiven Verdünnung.

(Um auf die Größenordnung des Virusgehaltes pro g Organ zu schließen, müssen daher die Werte zur Basis 10 delogarithmiert und mit dem Faktor 5 multipliziert werden, da jeweils 0,2 ml der Verdünnung auf den Zellrasen aufgebracht wurden.)

Insgesamt läßt sich feststellen, daß den Gruppen mit der geringsten Mortalität (Len + TM 72 h a.i.; D-316 + TM 3 h a.i.) auch der geringste Virusgehalt in den Organen entspricht, während die Gruppen mit der höchsten Mortalität (Len + TM 3 h a.i.; D-316 + TM 72 h a.i.) die höchsten Organtiter aufweisen. Diese Unterschiede sind am stärksten ausgeprägt im ZNS (Tabellen 6.17 und 6.18 c und d, Abb. 3.15 und 3.16 c und d). Im Rückenmark und im Gehirn finden wir in den Gruppen mit der niedrigsten Mortalität nur ganz sporadische und meist auch sehr niedrige positive Virusbefunde, in den Gruppen mit der

höchsten Mortalität liegen dagegen die Werte höher und persistieren länger. Diese starken Differenzen waren auch zu erwarten, da es der ZNS-Befall ist, an dessen Folgen die Tiere sterben.

Auch in den parenchymatösen Organen Leber und Milz sind die Unterschiede bei Infektion mit dem Stamm Len (Hvh-1) deutlich ausgeprägt. In beiden Organen ist der Virusgehalt am ersten Tag p.i. am höchsten und sinkt dann ab, so daß am vierten (Leber) bzw. fünften Tag (Milz) kein Virus mehr nachweisbar ist. In der Gruppe, die das TM 3 h a.i. erhalten hat, persistiert der positive Befund am längsten.

Bei dem Stamm D-316 (Hvh-2) ist das Bild in den viszeralen Organen dagegen weniger eindeutig. Wir hatten zunächst versucht, die Organtitrationen mit derselben niedrigen Infektionsdosis durchzuführen, wie wir sie für die Absterbeversuche verwandt hatten (2×10^3 pfu/Tier). Mit dieser Dosierung konnten wir jedoch in Leber und Milz kein Virus nachweisen. Auch mit höheren Dosen wurden keine konstanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen deutlich.

Wir nehmen an, daß die erhöhte Empfindlichkeit der Typ-2-Stämme gegenüber Umweltfaktoren (pH, toxische Substanzen in den Überständen der Organsuspensionen, thermische Inaktivierung), deren Einfluß wir nicht standardisieren konnten, zu den divergierenden und schlecht reproduzierbaren Werten geführt hat.

Wie der Vergleich der Verläufe für verschiedene Infektionsdosen zeigt (Tabellen 6.17 und 6.18, S. 191f.), beeinflußt deren Größe nicht nur die Höhe des Virusgehaltes in den viszeralen Organen, sondern auch die Zeitspanne nach der

Infektion, in der noch Virus nachweisbar ist. Die durch das TM hervorgerufenen Effekte, nämlich die Steigerung bzw. Abschwächung der Pathogenität, bleiben jedoch in ihrer Grundrichtung für hohe und niedrige Virusdosen dieselben. Im Rückenmark und im Gehirn ist die Höhe der gefundenen Virusgehalte und auch ihre zeitliche Verteilung offenbar nicht so stark dosisabhängig.

Für den Stamm Lennette können wir im Rückenmark Virus bereits am dritten Tag nachweisen, während positive Befunde im Gehirn erst am vierten bis fünften Tag auftreten. Bei dem Stamm D-316 finden wir zum ersten Mal Virus im Rückenmark am fünften bis sechsten Tag, im Gehirn bis auf sporadische niedrige Titer an den beiden vorausgehenden Tagen erst am siebten Tag. Diese zeitliche Diskrepanz im Auftreten der ersten positiven Virusbefunde im ZNS zwischen den beiden Virusstämmen steht in guter Übereinstimmung mit den später einsetzenden klinischen Krankheitszeichen und Todesfällen bei der Infektion mit dem Stamm D-316 im Vergleich zu der mit dem Stamm Lennette. Für beide Stämme wird durch das Ergebnis der Organ-titrations der Verdacht auf eine aufsteigende Ausbreitung der Viren vom lumbalen Rückenmark nach cranial bis ins Gehirn erhärtet.

Ein interessantes Faktum stellen die positiven Virusbefunde im Thymus in den Viruskontrollen und in den Gruppen mit der höchsten Mortalität (Len + TM 3 h a.i.; D-316 + TM 72 h a.i.) am ersten und zweiten und am sechsten bis zehnten Tag nach der Infektion dar.

Die positiven Befunde am ersten und zweiten Tag, die wir

nur nach der Infektion mit dem Stamm Len gefunden haben, wird man sich wahrscheinlich durch die primäre Virämie zu erklären haben, in deren Gefolge auch der gut vascularisierte Thymus befallen wird.

Welche Ursachen den späten positiven Befunden zugrundeliegen, können wir nicht mit Bestimmtheit sagen. Die einfachste Erklärung hierfür wäre, daß es sich um eine Thymusbesiedlung im Rahmen einer sekundären Virämie handelt, die gleichsam aufgrund eines "Überlaufmechanismus" durch den hohen Virusgehalt im ZNS entsteht. Dann müßte zu diesem Zeitpunkt aber auch Virus in anderen Organen, wie beispielsweise der Leber, der Milz, aber auch in Lunge und Niere nachweisbar sein. Diesbezügliche Untersuchungen haben wir nicht vorgenommen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um die Manifestation von occultem Virus in den immunkompetenten Zellen handelt. Für diese Hypothese spricht der Umstand, daß die Thymusproben meist erst nach einer langen Inkubationszeit (sechs Tage nach der Beimpfung) in den Kaninchennierenzellen cytopathische Effekte zeigten.

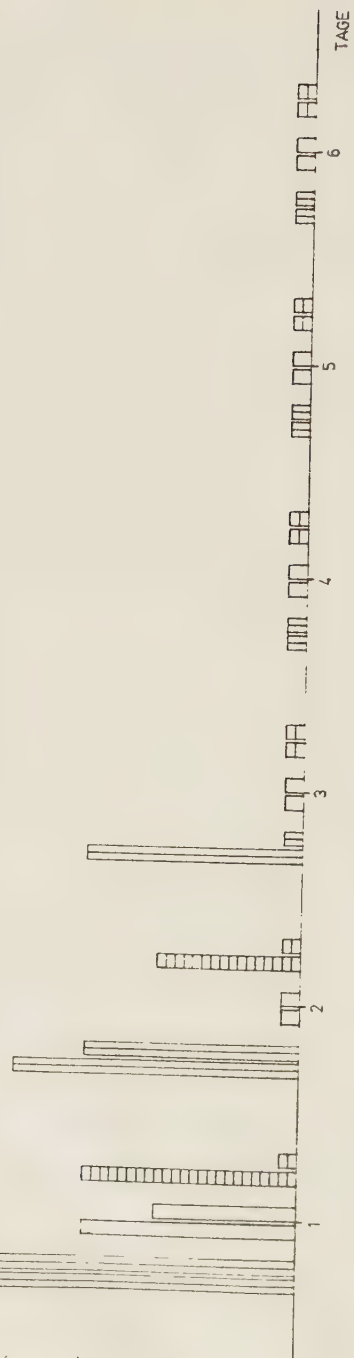
Um die Beurteilung von Artefakten durch degenerative Veränderungen am Zellrasen auszuschließen, haben wir die positiv erscheinenden Proben noch einmal überimpft und dann bereits am dritten Tag nach der Beimpfung cytopathische Effekte gesehen.

Eine kurze Zusammenfassung der positiven Thymusbefunde aus allen in-vivo-Untersuchungen findet sich in Abschnitt 3.2.4. (S.102).

TITER Ig plu

Abb. 3.14

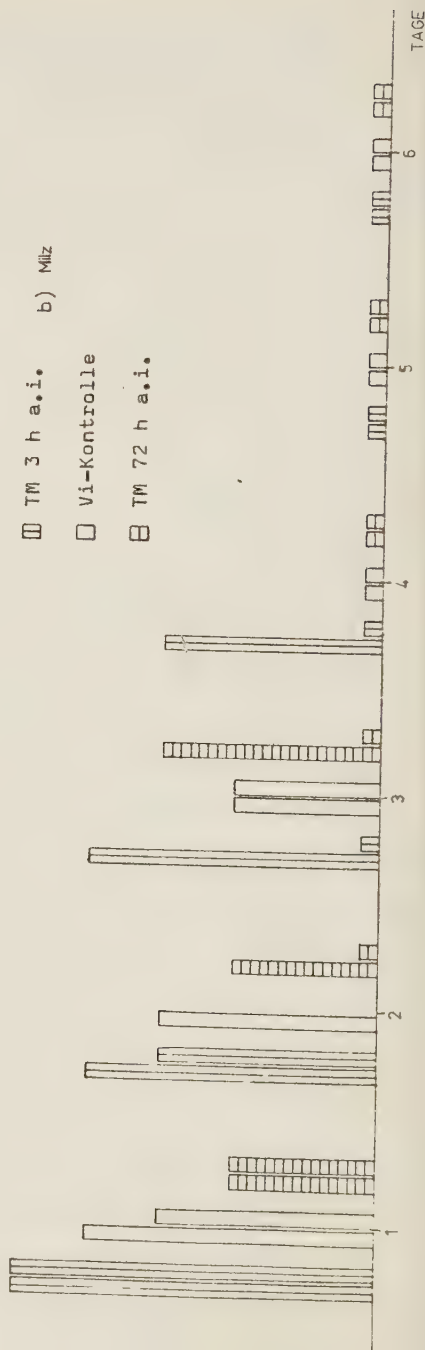
Virusgehalt in den Organen von NMRI-Mäusen bei Infektion mit dem Stamm Lennette
a) Leber



TITER Ig plu

1
88
1

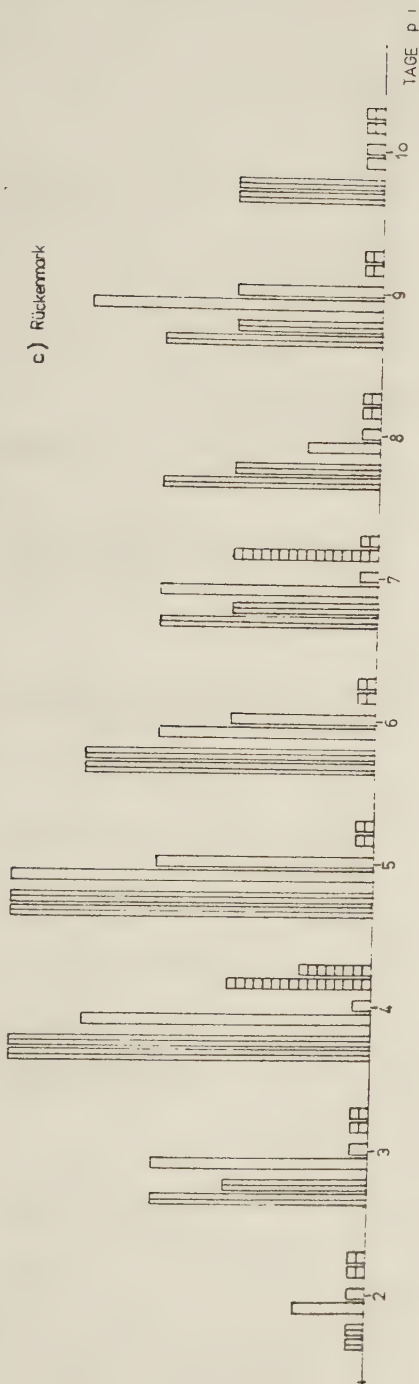
TM 3 h a.i. b) Milz
Vi-Kontrolle
TM 72 h a.i.



TAGE p.i.

Abb. 3.14 (Fortsetzung)

c) Rückenmark



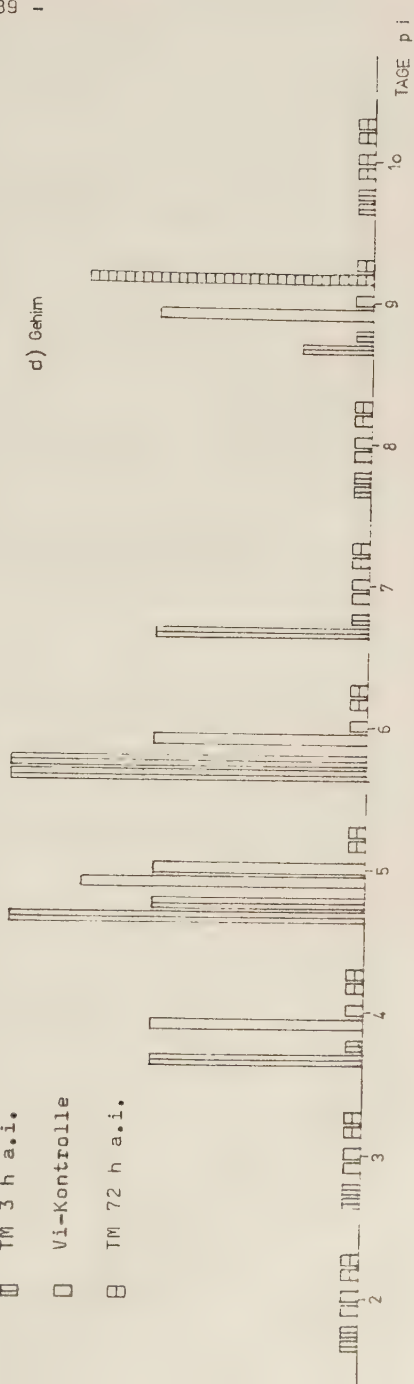
ITER Ig pfu

TM 3 h a.i.

Vi-Kontrolle

TM 72 h a.i.

d) Gehirn



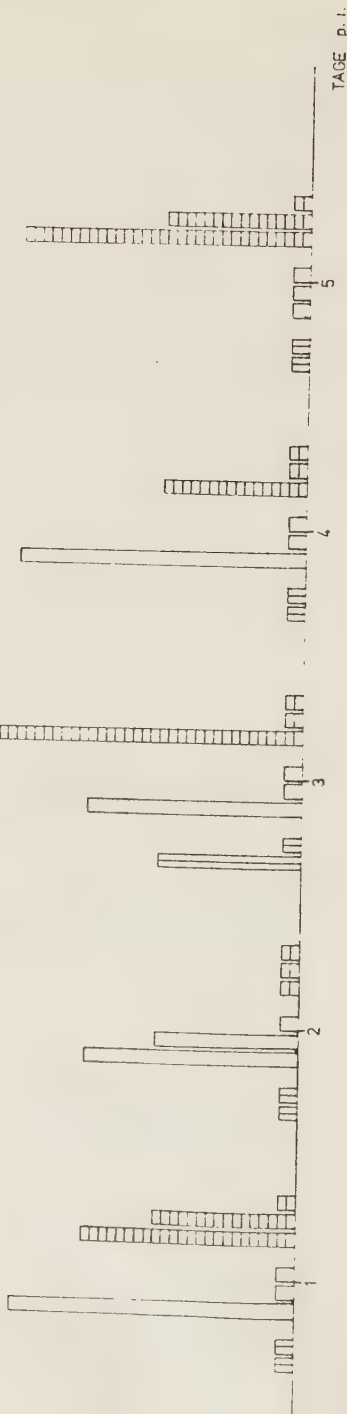
TITER Ig p/u

Abb. 3.15

Virusgehalt in den Organen
unter Vorbehandlung mit TM

von NWKI-Mäusen bei Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2)

a) Leber



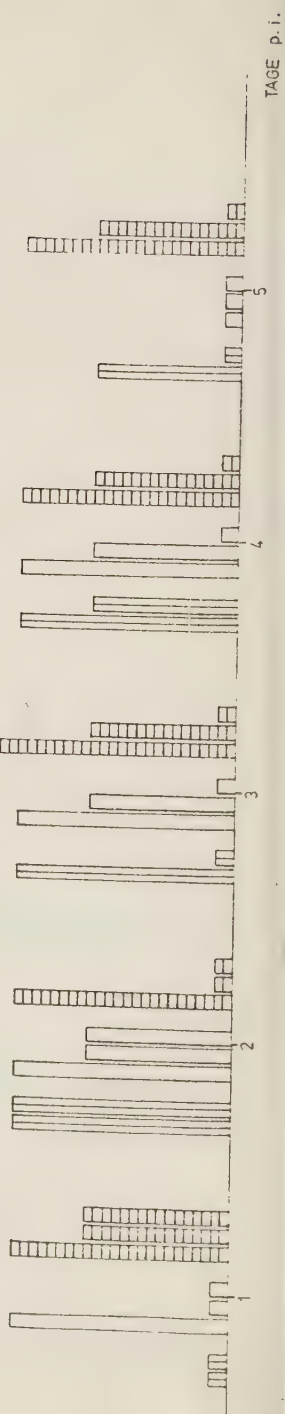
TITER Ig p/u

□ TM 3 h a.i.

□ Vi-Kontrolle

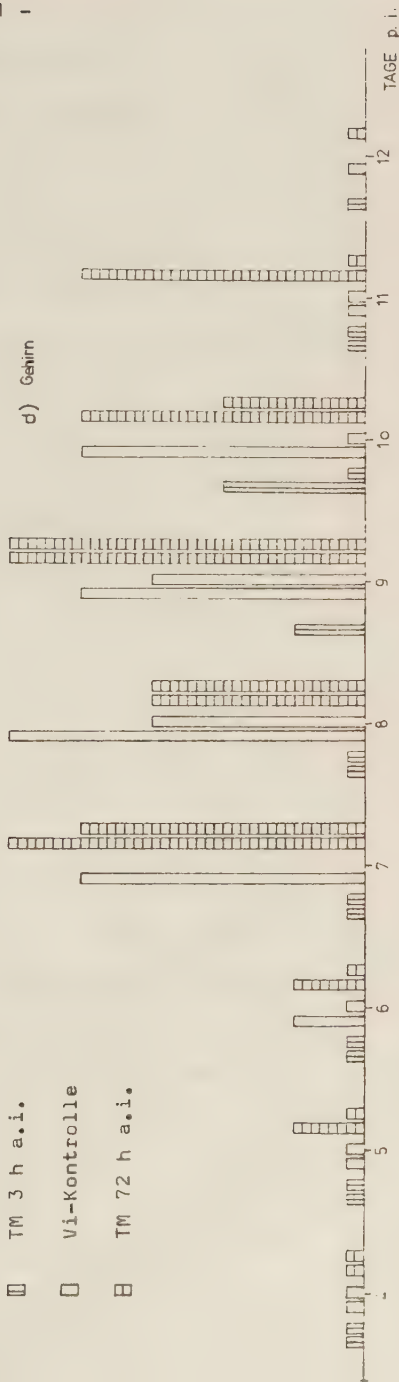
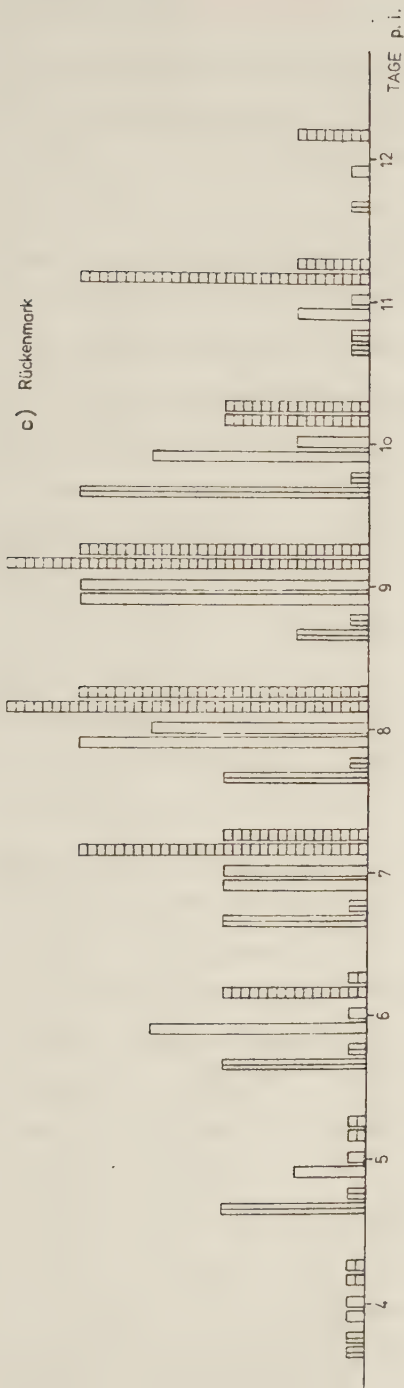
▨ TM 72 h a.i.

b) Milz



TAGE p. i.

Abb. 3.15 (Fortsetzung)



TM 3 h a.i.

Vi-Kontrolle

TM 72 h a.i.

3.2.3. Die unterschiedliche Empfänglichkeit der NMRI- und C57-Mäuse gegenüber der Infektion mit Herpesviren

3.2.3.1. Intraperitoneale Inoculation

Bei den in Abschnitt 3.1.2. der Ergebnisse geschilderten *in vitro*-Untersuchungen haben wir eine geringere bis fehlende Multiplikationsrate der Herpesviren in den Makrophagen der NMRI-Mäuse gefunden. Wir haben uns daher gefragt, ob auch in der Suszeptibilität der Tiere in vivo Unterschiede zwischen den NMRI- und den C57-Mäusen bestehen.

Es wurden daher vier bis fünf Wochen alte NMRI- und C57-Mäuse mit 0,1 ml der in Zehnerschritten verdünnten Virussuspensionen der Stämme Lennette (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2) i.p. infiziert. Die Mortalität bzw. Morbidität in den einzelnen Versuchsgruppen wurde registriert und die LD 50 bzw. ID 50 nach der Methode von Reed und Muench bestimmt (69).

Wie die Ergebnisse in Tabelle 6.19 (S. 195) zeigen, beträgt bei den NMRI-Mäusen die LD 50 für den Stamm Len (Hvh-1) 1.5×10^6 pfu/Tier, die ID 50 3.1×10^4 pfu/Tier. Von den C57-Mäusen erkrankte und starb nur 1 Tier in der Gruppe mit unverdünntem Virus, alle anderen Tiere blieben gesund. Dies bedeutet, daß die ID 50 und die LD 50 der C57-Mäuse für eine i.p. Infektion mit dem Stamm Len weit über der Dosis liegen müssen, die wir mit der Gabe von unverdünntem Virus (1.5×10^6 pfu/Tier) erreichen konnten.

Auch gegenüber dem Stamm D-316 (Hvh-2) erwiesen sich die C57-Mäuse als weitgehend resistent (Siehe Tabelle 6.20, S. 195). Während sich für die NMRI-Mäuse für die LD 50 ein Wert von 4.8×10^2 pfu/Tier ergab, wurde wiederum die LD 50 für die

C57-Mäuse auch mit unverdünntem Virus (2.2×10^5 pfu/Tier) nicht erreicht. Nur ein Tier in der Gruppe mit unverdünntem Virus starb.

Die Vermutung lag nahe, daß die beobachtete Resistenz der C57-Mäuse gegenüber der i.p. Herpesinfektion in ursächlichem Zusammenhang mit der in vitro beobachteten Restriktion der Viren in den C57-Makrophagen stünde.

Wir versuchten daher, die Makrophagenbarriere der C57-Mäuse auszuschalten, indem wir sie 8 h vor der Infektion mit Dextransulfat 500 i.p. vorbehandelten (2mg/Maus).

(DS 500 ist eine Substanz, die die Makrophagen selektiv schädigt und zu einer Erhöhung der Pathogenität des Stammes Len bei i.p. Infektion führt (41).)

Anschließend wurden die vorbehandelten C57-Mäuse mit 5×10^5 pfu/Tier des Stammes Len bzw. 5×10^5 pfu/Tier des Stammes D-316 infiziert und ihre Mortalität bzw. Morbidität im Vergleich zu reinen Virus-Kontrollgruppen von C57- und NMRI-Mäusen registriert.

Wie aus den Tabellen 6.21 und 6.22 hervorgeht (S. 196 u. 197), erkrankten auch die mit DS vorbehandelten C57-Mäuse nicht. Offenbar hat also die Ausschaltung der Makrophagenbarriere im Bereich der Wirkung des DS 500 keinen Einfluß auf die Resistenz der C57-bl-Mäuse gegenüber der intraperitonealen Herpesinfektion.

3.2.3.2. Intracerebrale Inoculation

Auf der Suche nach den Ursachen der beobachteten Resistenz der C57-Mäuse gegenüber der Herpesinfektion haben wir uns dann weiter gefragt, ob diese auch dann noch bestehen bleibt, wenn das Virus direkt in das ZNS injiziert wird. Wäre dies der Fall, so würde dies für eine geringere Empfänglichkeit des Nervengewebes der Blackmäuse und damit für eine Resistenz auf zellulärer Ebene sprechen.

Analog zu den i.p. Vergleichstitrationen wurden vier bis fünf Wochen alte NMRI- und C57-Mäuse in Äthernarkose intracerebral mit 0.03 ml einer in Zehnerschritten verdünnten Virussuspension der Stämme Len und D-316 infiziert und die Mortalität in den einzelnen Versuchsgruppen beobachtet. Die Tabellen 6.23 und 6.24 (S. 198) zeigen die Mortalitätsraten in den einzelnen Gruppen nach Abschluß des Versuches (16. d.p.i.). In den folgenden Tabellen 3.7 und 3.8 sind die nach Reed & Muench berechneten (69) i.c.-LD 50-Werte für beide Mäusestämme vergleichend zusammengestellt.

Tabelle 3.7 i.c.-LD 50-Werte für NMRI und C57-Mäuse nach Infektion mit dem Stamm Lennette (Hvh-1)

Vers. Nr.	LD 50 (NMRI)	LD 50 (C57)	$\log (\text{LD } 50 \text{ NMRI})$ $-\log (\text{LD } 50 \text{ C57})$
1	$10^{-5.17}$	$10^{-4.78}$	0.39
2	$10^{-4.37}$	$10^{-4.50}$	-0.13

Tabelle 3.8 i.c.-LD 50-Werte für NMRI- und C57-Mäuse nach Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2)

Vers. Nr.	LD 50 (NMRI)	LD 50 (C57)	$\log (\text{LD } 50 \text{ NMRI})$ $-\log (\text{LD } 50 \text{ C57})$
1	$10^{-5.16}$	$10^{-2.83}$	2.33
2	$10^{-4.45}$	$10^{-3.31}$	1.14
3	$10^{-5.00}$	$10^{-3.48}$	1.52

Die Ergebnisse zeigen, daß der Stamm Lennette (Hvh-1) bei intracerebraler Inoculation für beide Mäusestämme ungefähr gleich pathogen ist, während für den Stamm D-316 (Hvh-2) in allen drei Parallelversuchen eine Differenz zwischen den LD 50-Werten der NMRI- und C57-Mäuse von über einer log-Stufe bestehen bleibt. Wir können den Befund nur so deuten, daß an der Resistenz der C57-Mäuse gegenüber diesem Stamm (auch) eine verminderte Empfänglichkeit des neuralen Gewebes für die Infektion, also eine Resistenz auf zellulärer Ebene, beteiligt ist.

Weiterhin fällt auf, daß die beiden Virusstämme, deren Pathogenität für die NMRI-Mäuse bei intraperitonealer Infektion um den Faktor 100 differierte ($i.p.-LD\ 50\ (Len) = 5 \times 10^5$ pfu/Tier; $i.p.-LD\ 50\ (D-316) = 2 \times 10^3$ pfu/Tier), bei der intracerebralen Infektion nahezu gleiche Pathogenität besitzen. Dies deutet darauf hin, daß die hohe Pathogenität des Stammes D-316 bei peripherer Inoculation in NMRI-Mäusen wahrschein-

gewebe zu penetrieren, also auf einer starken Neuroinvasivität.

3.2.3.3. Der Virusgehalt in den Organen der NMRI- und C57-bl-Mäuse nach intraperitonealer Infektion

Wir haben uns nun gefragt, ob die unterschiedliche Resistenz der beiden Mäusestämme gegenüber der i.p. Herpesinfektion ihren Ausdruck auch im Virusgehalt der Organe findet.

Wir haben daher vier bis fünf Wochen alte NMRI- und C57-Mäuse mit möglichst hohen Virusdosen infiziert und den Virusgehalt in den Organen wie in 3.2.2.6. beschrieben bestimmt. (Siehe Tabellen 6.25 und 6.26 (S. 199-201), Abb. 3.16 und 3.17).

Für den Stamm Lennette ergeben sich bereits in den parenchymatösen Organen Leber und Milz Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen. Am ersten Tag p.i. ist der Virusgehalt in NMRI- und C57-Mäusen derselbe, dann jedoch scheint er in den C57-Tieren schneller wieder abzusinken.

Für den Stamm D-316 finden wir dagegen in Leber und Milz keine eindeutigen Differenzen zwischen den beiden Mäusestämmen. Da wir auch bei den Organtitrationen unter Vorbehandlung mit TM (3.2.2.6.) in den viszerale Organen für den Stamm D-316 divergierende und schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhalten haben, nehmen wir aus den bereits dort angeführten Gründen die erhöhte Labilität dieses Hvh-2-Stammes gegenüber Umwelteinflüssen als Ursache für die inkonstanten Befunde an, die sich besonders in den zell- und virustoxischen Suspensionen von Leber und Milz bemerkbar macht.

Im Rückenmark führen beide Virusstämme bei den C57-Mäu-

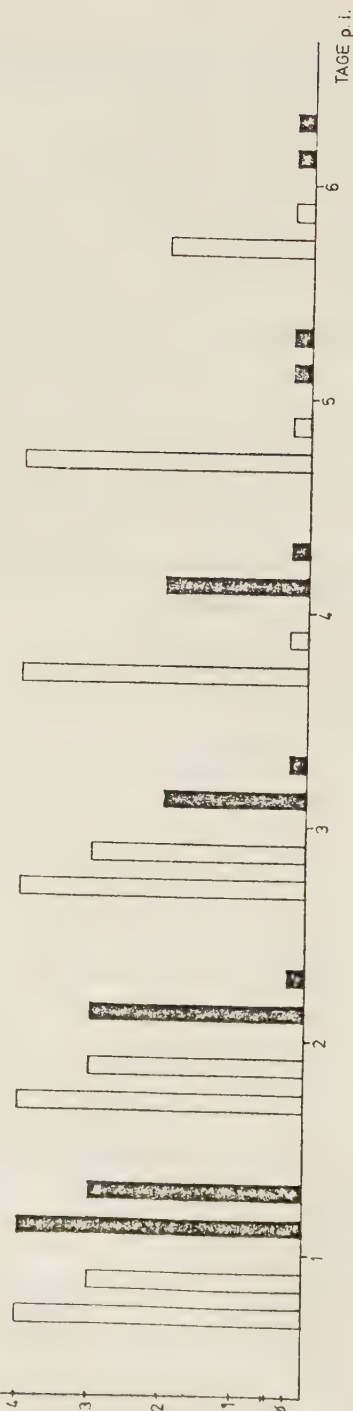
sen zu niedrigen und nur für kürzere Zeit persistierenden Titern, wobei die Unterschiede für den Stamm D-316 noch deutlicher zu Tage treten als für den Stamm Lennette. Soweit die geringe Anzahl von Versuchen eine solche Interpretation zuläßt, dringen wohl - erstens - weniger Herpesviren in das ZNS der C57-Mäuse ein. Darüber hinaus scheinen sich jedoch - zweitens - die bereits in das ZNS eingedrungenen Erreger weniger gut vermehren zu können als im ZNS der NMRI-Mäuse oder aber - durch uns unbekannte Mechanismen - schneller aus ihm eliminiert zu werden. In diesem Sinne zeigt auch die signifikante Differenz der i.c.-LD 50-Werte zwischen NMRI- und C57-Mäusen für den Stamm D-316 von über einer log-Stufe (3.2.3.2.), daß - zumindest für diesen Hvh-2-Stamm - auch eine verminderte Suszeptibilität des ZNS-Gewebes selbst an der Resistenz der C57-Mäuse beteiligt sein muß.

TITER Ig pfu

Abb. 3.16

Virusgehalt in den Organen der NMRI- und C-57-Mäuse nach Infektion mit dem Stamm Lennette (Hvh-1)

a) Leber

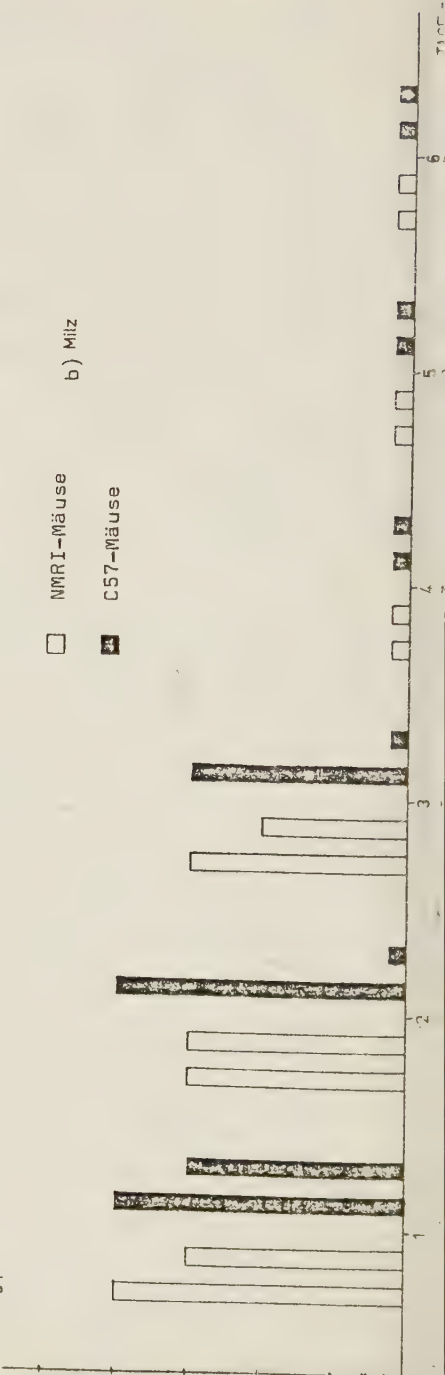


TITER Ig pfu

b) Milz

□ NMRI-Mäuse
■ C57-Mäuse

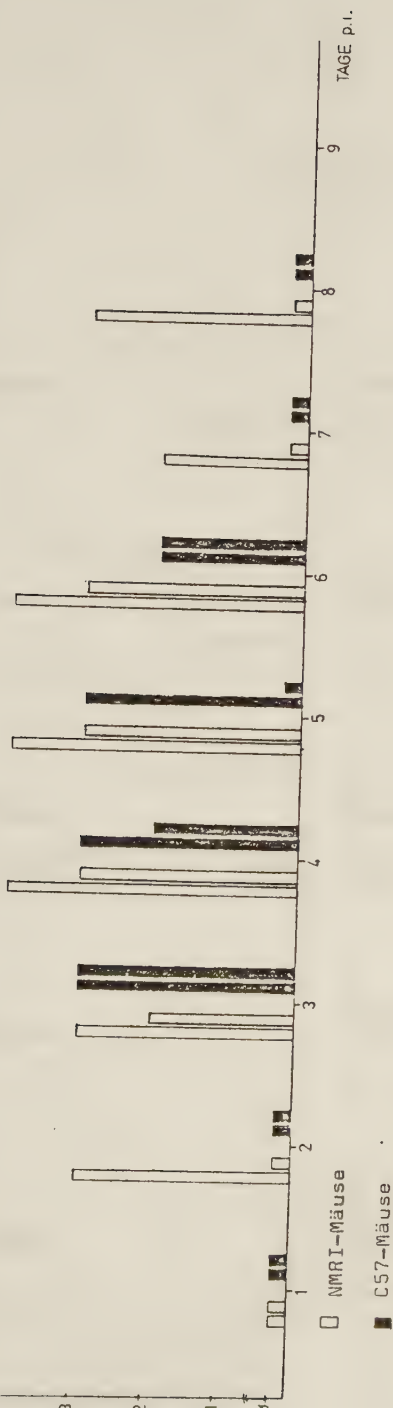
1 98 1



TITER Ig pfu

Abb. 3.16 (Fortsetzung)

c) Rückenmark



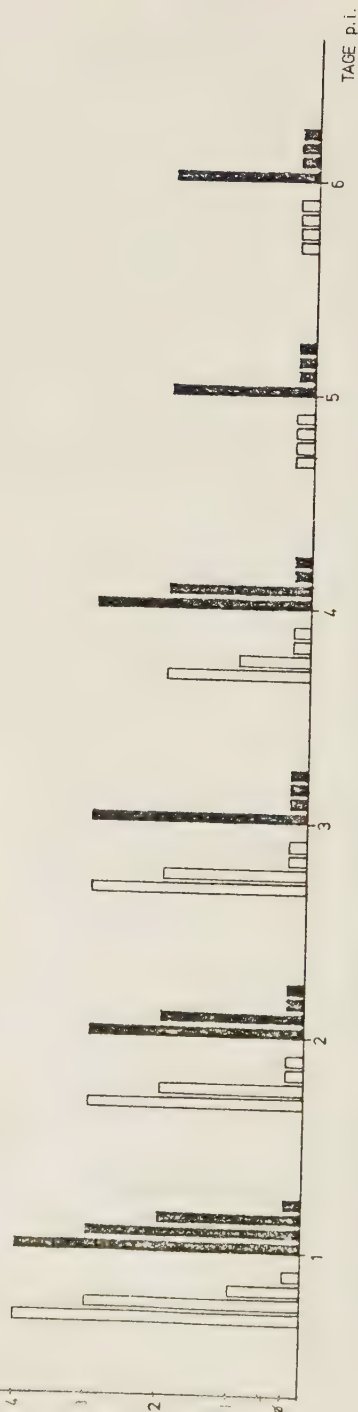
1
9
1

TITER Ig pfu

Abb. 3.17

Virusgehalt in den Organen der NMRI- und C57-Mäuse nach Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2)

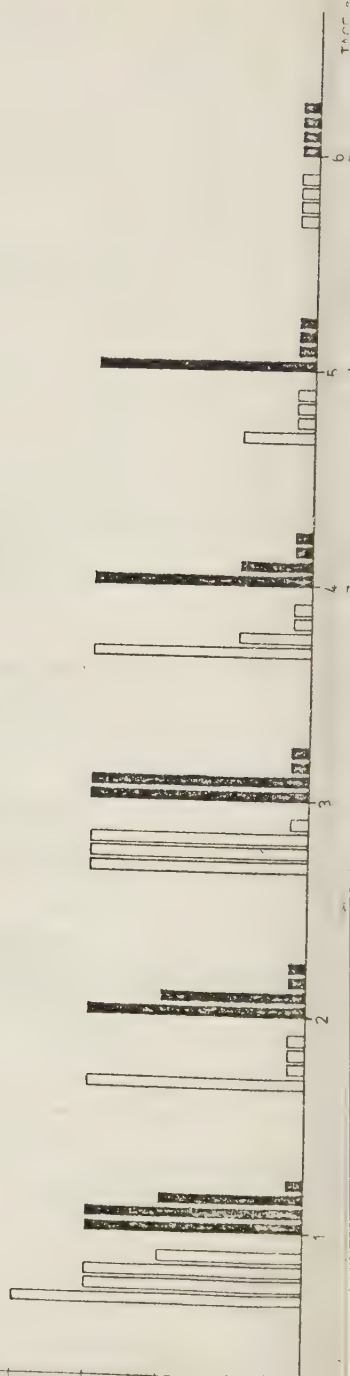
a) Leber



TITER Ig pfu

□ NMRI-Mäuse
■ C57-Mäuse

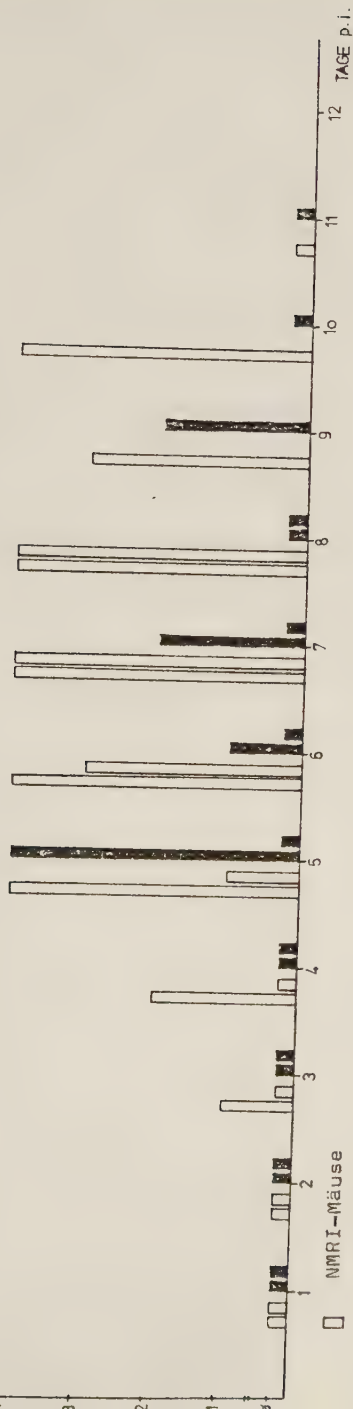
b) Milz



TITER Ig p/u

Abb. 3.17 (Fortsetzung)

c) Rückenmark



3.2.4. Anhang: Positive Virusbefunde im Thymus

Auch in den zuletzt geschilderten Untersuchungen konnten wir aus dem Thymus der NMRI-Mäuse wiederum Virus isolieren (vgl. 3.2.2.6., S. 83). Eine zusammenfassende Darstellung der positiven Thymusproben aus allen Versuchen enthalten die Tabellen 6.27 und 6.28 und die Abbildung 3.18 auf der folgenden Seite.

Für die C57-Mäuse fanden sich weder bei Infektion mit dem Stamm D-316 noch mit dem Stamm Lennette positive Befunde nach dem 3. d.p.i.. Bei den NMRI-Mäusen wiesen jeweils nur die Virus-Kontrollgruppen und die Gruppen mit der höchsten Mortalität (Len + TM 3 h a.i.; D-316 + TM 72 h a.i.) positive Virusbefunde am sechsten bis zehnten Tag p.i. auf, wobei deren relative Häufigkeit für D-316 etwas größer erscheint als für den Stamm Lennette.

rel. Häufigkeit

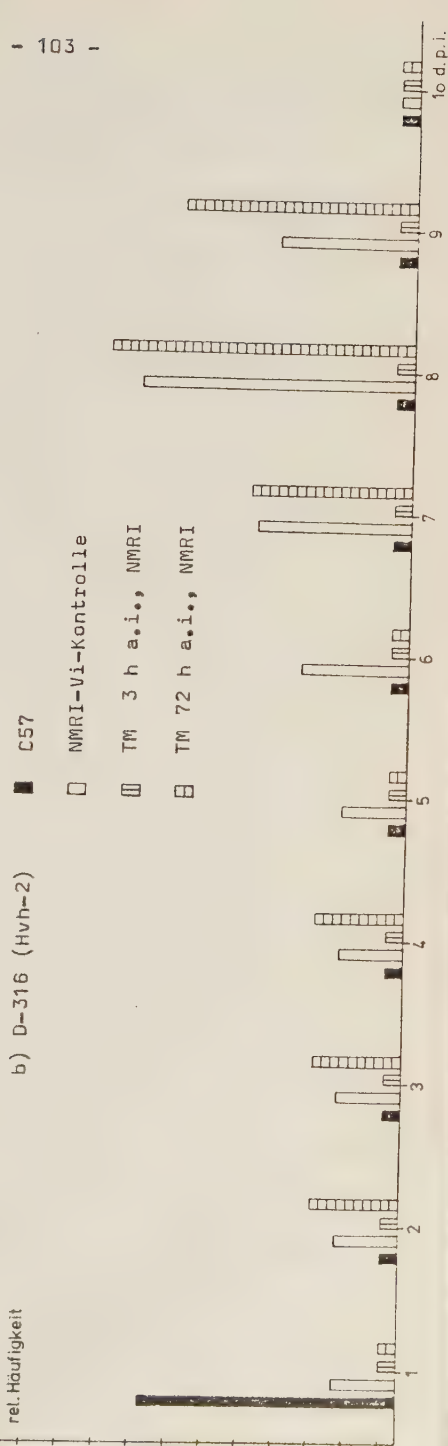
Abb. 3.18 Relative Häufigkeiten positiver Thymusbefunde bei Infektion mit

a) Lennette (Hvh-1)



- 103 -

b) D-316 (Hvh-2)



4. Diskussion

4.1. Die Vermehrung von Herpesviren in den Makrophagen und Fibroblasten der NMRI- und C57-bl-Mäuse in vitro

Wie unsere Ergebnisse über die Vermehrung von Herpesviren in den Makrophagen in vitro zeigen (siehe Tabelle 3.1, S. 55) besteht hinsichtlich dieser Eigenschaft eine Rangordnung innerhalb der untersuchten Virusstämme:

Der Stamm Lenette (Hvh-1) vermehrt sich in normalen und stimulierten NMRI-Makrophagen, jedoch weder in normalen noch in stimulierten C57-Makrophagen. Auch in den normalen Makrophagen von Balb-c- und CBA-Mäusen läßt sich eine geringgradige Vermehrung feststellen.

Die anderen Typ-1-Stämme L3-2S und IES und der intermediale Stamm ER zeigen keine Virusmultiplikation in normalen NMRI-, jedoch eine deutliche in stimulierten NMRI-Makrophagen. Weder in normalen noch in stimulierten C57-Makrophagen findet eine Vermehrung statt; allenfalls für den Stamm ER ergibt sich in den stimulierten C57-Makrophagen eine Titerkonstanz bis zur 48-ten Stunde p.i..

Bei den getesteten Hvh-2-Stämmen D-316 und DD wurde in normalen NMRI- und in normalen und stimulierten C57-Makrophagen ab der 12-ten h.p.i. ein steiler Abfall des Virusgehaltes sichtbar, der deutlich ausgeprägter war als bei den untersuchten Typ-1-Stämmen. In stimulierten NMRI-Makrophagen konnten wir jedoch für den Stamm D-316 eine geringgradige Vermehrung, für den Stamm DD zumindest eine Titerkonstanz bis zur 48-ten Stunde feststellen. Wir interpretieren diese Ergebnisse dahin gehend, daß sich auch die Hvh-2-Viren in den stimulierten

NMRI-Makrophagen vermehren können. Ihre stärkere Temperaturlabilität (vgl. Kap. 3.1.1.) sowie ungünstige pH-Verhältnisse (79) während der Inkubation bewirken aber wahrscheinlich die Inaktivierung eines größeren Teils des im Überstand befindlichen Virus, so daß ihre Vermehrungstendenz weniger deutlich zum Ausdruck kommt als bei den Typ-1-Stämmen.

Einzig das frische Isolat "Eckert" (Hvh-1) weicht in seinem Vermehrungsverhalten in den verschiedenen Makrophagenkulturen von den anderen Virusstämmen ab, indem es sich in allen Kulturen, also auch in normalen und stimulierten C57-Makrophagen vermehrt, und zwar ebenso gut wie in den entsprechenden NMRI-Zellen. Obwohl wir die genaue Ursache für das atypische Verhalten nicht kennen, nehmen wir an, daß die hohe Multiplikationsrate dieses Virusstammes in allen Makrophagenkulturen mit der Tatsache in Zusammenhang zu bringen ist, daß es sich hierbei um einen frisch isolierten Stamm in der ersten und zweiten Zellpassage handelt.

Die beiden Prototypen Lennette (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2) wurden in unserem Labor bezüglich ihrer Vermehrungspotenz in Makrophagen auch mit biochemischen Methoden untersucht (137). Übereinstimmend mit unseren eigenen Untersuchungen zeigte sich dabei, daß Virus-DNA der beiden Stämme nur in den NMRI-, nicht aber in den C57-Makrophagen synthetisiert wird. Während sich die Herpesviren in den NMRI-Makrophagen also vermehren können, wird in den C57-Makrophagen - auf welche Weise auch immer - für alle untersuchten Hvh-Stämme mit Ausnahme des frischen Isolats - die Multiplikation der Herpesviren gehemmt.

Die von uns beobachtete Vermehrung der Herpesviren in den NMRI-Makrophagen ist von sehr begrenztem Ausmaß, sie um-

faßt etwa eine Zehnerpotenz. Die Höhe der absoluten Titer schwankte von Versuch zu Versuch stark, oft bestand aber auch im relativen Verlauf der Kurven eine starke Inkonstanz. Es ist uns nicht gelungen, in den Petrischalen von stimulierten und normalen Makrophagen zuverlässig dieselbe Zellzahl einzustellen, selbst wenn wir vor dem Aussäen eine Zellzählung vornahmen, da von den aktivierten Makrophagen ein höherer Prozentsatz fest adhärierte und ebenfalls ein größerer Teil das Waschen mit 25 ml Hanks-Lösung nach der Infektion überstand. Näherungsweise schwankte die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt zwischen 5×10^5 und 1×10^6 pro Petrischale. Die Infektionsdosis war jedoch in jedem Versuch so hoch gewählt, daß das Verhältnis von Virus zu Makrophagen immer größer oder gleich 1 war.

Welche Vorstellungen können wir uns von den Ursachen der unterschiedlichen Vermehrbarkeit der Herpesviren in den Makrophagen machen?

Der intrazellulären Virusvermehrung und der anschließenden Freisetzung infektiöser Teilchen in das Kulturmedium stehen eine Reihe von Faktoren gegenüber, die die Tendenz haben, den Virusgehalt im Überstand zu senken. Koszinowski et al. (78) fassen alle diese Komponenten unter dem Begriff der "Virusclearance" zusammen:

Zunächst müssen wir auch hier den Einfluß der chemisch-physikalischen Parameter, nämlich der thermischen Inaktivierung und der durch das pH in Betracht ziehen. Darüberhinaus zeigen jedoch die in unserem Versuchsaufbau verwandten Makrophagen selbst eine gesteigerte Tendenz, das Virus aus dem Überstand zu entfernen (78). Für dieses Verhalten der Makrophagen sind,

wie Koszinowski et al. (78) an ihrem Vacciniavirusmodell nachwiesen, in erster Linie zwei Ursachen zu nennen, nämlich erstens die Anwesenheit von inaktiviertem Serum im Medium und zweitens die Aktivierung der Zellen durch TM. Für das Vacciniavirus traten durch diese beiden Parameter bei einer Inkubationsdauer von 24 h erhebliche Titerreduktionen im Überstand auf, nämlich um 40 % des Ausgangswertes für ein Medium mit 10 % inaktiviertem Kälberserum und um zusätzliche 16 % bei vorheriger TM-Aktivierung.

Auf die Steigerung der Phagozytose durch die Anwesenheit auch von inaktiviertem Serum haben bereits North (112) und Cohn & Benson (22) in ihren Untersuchungen hingewiesen. North und Koszinowski (112, 78) machen opsonisierte Elemente auch im nicht-immunen, komplementfreien Serum für diesen Effekt verantwortlich, deren Wirkungsmechanismus man sich etwa in einer Umhüllung der negativen Ladung der Partikel vorzustellen hätte, die es den ebenfalls negativ geladenen Phagozyten leichter möglich machte, die Teilchen aufzunehmen. Da sich die Vorgänge der Pinozytose und der Phagozytose nur hinsichtlich der ingestierten Partikelgröße, nicht aber hinsichtlich des Wirkungsmechanismus voneinander unterscheiden, nehmen wir an, daß dieselben Prozesse auch bei der Aufnahme der Viruspartikel durch Pinozytose ablaufen. Dementsprechend konnte Cohn (20) anhand licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen nachweisen, daß auch die Pinozytose durch die Anwesenheit von Serum, auch wenn es vorher inaktiviert worden war, drastisch gesteigert wurde.

Da auch das Thioglycollat-Medium, ebenso wie Endotoxin und andere unspezifisch aktivierende Substanzen eine erhöhte

Anzahl von Pinozytosevesikeln in den aktivierten Makrophagen induziert, ist es höchst wahrscheinlich, daß bezüglich des Virusclearance-Phänomens den Einflüssen der TM-Aktivierung und der Anwesenheit von inaktiviertem Serum im Medium derselbe Wirkungsmechanismus zugrundeliegt, nämlich eine Steigerung der Pinozytoseaktivität. Nach Koszinowski et al. (78) ist die beobachtete Virusclearance unabhängig von der Virusmenge, d.h. bei einer niedrigen Konzentration ist der Abfall genauso steil wie bei einer höheren.

Die Vorgänge bei der Infektion von Makrophagen durch Herpesviren liegen noch weitgehend im Dunkeln. Es ist bis jetzt noch unbekannt, welcher Anteil des Virusinokulum von den Makrophagen phagozytiert und unschädlich gemacht wird und welcher Anteil die Zelle tatsächlich infiziert und damit die Zelle zerstört. Wir wissen auch nicht, ob diese "Infektiosität" der Herpesviren für die Makrophagen für alle Stämme dieselbe ist oder ob es etwa Stamm- oder typenspezifische Unterschiede innerhalb der Gruppe der Herpesviren gibt.

Bei der geringen Spezifität der Prozesse, die für das Phänomen der Virusclearance im Vacciniamodell verantwortlich sind, liegt die Vermutung nahe, daß dieselben Vorgänge zur Titerreduktion auch bei der Infektion mit Herpesviren stattfinden. Wahrscheinlich kommt aber bei dieser Virusgruppe noch ein weiteres Phänomen hinzu: Stevens & Cook (154) konnten nämlich zeigen, daß eine 30-minütige Inkubation einer bekannten Virusmenge in dem Überstand einer 24 h vorher infizierten Makrophagenkultur den Titer dieser Probe drei bis vier mal so stark reduzierte wie eine ebenso lange Inkubation in reinem Kulturmedium. Die Autoren schlossen daraus, daß die Viren durch

bestimmte, von den Zellen freigesetzte Produkte, von denen ihnen die lysosomalen Hydrolasen oder ähnliche Enzyme als die wahrscheinlichsten Kandidaten erschienen, zerstört wurden.

Alle der bis jetzt genannten Faktoren müßten also zu einem Abfall des Virusgehalts im Überstand der Proben führen, der insgesamt noch steiler verlaufen müßte als die Inaktivierungskurven unserer beiden Prototypen Lennette und D-316 bei 37°C (vgl. Abb. 3.1). Daraus folgt, daß nach unseren Ergebnissen, auch bei einem nur leichten Anstieg oder sogar bei einem horizontalen Verlauf unserer Kurven, also einer Titerkonstanz, an einer geringgradigen Vermehrung der Herpesviren in den NMRI-Makrophagen nicht zu zweifeln ist, wobei diese aber wesentlich geringer erscheint als in den Fibroblasten oder anderen somatischen Zellen.

Der Einwand, die in unseren Kulturen beobachtete leichte Vermehrung sei auf deren Verunreinigung mit Fibroblasten zurückzuführen, ist dahingehend zu entkräften, daß wir dann eine zufällige Verteilung der Vermehrungstendenz über die Makrophagenkulturen beider Mäusestämme - NMRI und C57-bl - zu erwarten hätten und nicht wie in unseren Versuchen eine Begrenzung dieses Phänomens auf die NMRI-Makrophagen. Außerdem wäre unter dieser Annahme der Anstieg der Vermehrungsrate in stimulierten Makrophagen nicht zu erklären, da im Zuge der unspezifischen Aktivierung der Peritonealhöhle nur die Zahl der Phagozyten, aber kaum die der Fibroblasten erhöht wird.

Das Verhalten von Herpesviren in Makrophagenkulturen in vitro wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen experimentell geprüft. Dabei variieren die Ergebnisse je nach den verwandten Virus- und Wirtstierstämmen von einer nachweisbaren Vermeh-

rung bis zu einer praktisch vollständigen Restriktion.

So ist eine Vermehrung von Herpesviren in Kaninchenperitonealzellen um circa eine Zehnerpotenz bereits 1955 von Barski et al. (182) beschrieben worden.

Im Gegensatz zu diesen und unseren Untersuchungen fanden Stevens & Cook (154) keinen Anhalt für eine Vermehrung der Herpesviren in Mäusemakrophagen (Stamm BRVS-Swiss). Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, wurden hauptsächlich defekte Viruspartikel synthetisiert, bei denen die Virus-DNA fehlerhaft in das Capsid eingebaut war.

Die Adsorption und die Proteinsynthese liefen dagegen ungestört ab. Neben den zahlreichen inkompletten Partikeln wurde zwar auch eine geringe Menge intakter Viren freigesetzt, von diesen wenigen infektiösen Teilchen wurde jedoch wiederum ein großer Anteil durch zelluläre Produkte im Überstand der Kulturen - wahrscheinlich lysosomale Enzyme - wieder zerstört (Siehe auch S. 109). Die Autoren kamen daher zu dem Schluß, daß die Vermehrung der Herpesviren in den Makrophagen als praktisch abortiv angesehen werden könne.

Demgegenüber beobachteten wiederum Kirchner et al. (76) eine minimale Vermehrung von Herpesviren in den Peritonealmakrophagen verschiedener Mäusestämme (D2 u.a.), sie fanden jedoch eine wesentlich stärkere in den B-Lymphozyten der Milz, wenn diese vorher mit LPS stimuliert worden waren.

In jüngster Zeit konnten auch Sethi & Brandis (209) eine Vermehrung der Hvh-1-Stämme Thea und Haase in TM-stimulierten Makrophagen von DBA-, Balb-c- und AKR-Mäusen nachweisen, während sie in TM-stimulierten C57-bl-Makrophagen eine Restriktion fanden.

Somit ist die Vorstellung, daß die Herpesviren in den Makrophagen einen abortiven Zyklus durchlaufen (6, 154) nicht mehr als allgemein gültig aufrechtzuerhalten. Vielmehr gibt es offenbar einige Hvh-Stämme, die sich in den Makrophagen einiger Mäusestämme vermehren können.

Die Multiplikationsrate der Viren in den Makrophagen liegt jedoch weit unter der in den anderen somatischen Zellen. Dies ist dadurch zu erklären, daß an der Interaktion der Viren mit den Makrophagen zwei gegenläufige Vorgänge beteiligt sein müssen, nämlich die Vermehrungstendenz der Viren in den Zellen auf der einen, aber auch zelluläre Abwehrmechanismen auf der anderen Seite, die zu einer Restriktion der Virusvermehrung führen. Welche der beiden Kräfte überwiegt, hängt einmal von der Multiplikationspotenz des jeweiligen Virusstammes, zum anderen vom Restriktionsvermögen der verwandten Makrophagen ab.

Von dieser Vorstellung her wird verständlich, daß einige Virusstämme (Len, Isolat) sich in normalen NMRI-Makrophagen gut vermehren können, während andere dies nicht oder nur ganz schwach tun, und daß andererseits nur in den Makrophagen der NMRI-Mäuse, nicht aber in denen der C57-Mäuse eine Vermehrung der Herpesviren stattfindet.

Eine Antwort auf die Frage, ob die bei unserer in-vitro-Konstellation gewonnenen Resultate auf die Verhältnisse in vivo zu übertragen sind, d.h. ob die von uns beobachtete Vermehrung der Herpesviren auch bei dem völlig veränderten Verhältnis der Anzahl der Viren zu der der Makrophagen unter in-vivo-Bedingungen sich als nicht abortiv erweisen würde, muß der weiteren experimentellen Prüfung überlassen bleiben.

Bereits Gresser & Lang (52) betonten, daß es nicht zulässig sei, von der Vermehrbarkeit eines Virus in Makrophagen in vitro auf ein entsprechendes Verhalten in vivo zu schließen, da die Eigenschaften der Phagozyten - wie die aller Zellen - durch die Kulturbedingungen verändert würden.

Die Aktivierung der Makrophagen mit TM erhöht offenbar die Vermehrungstendenz der Herpesviren in diesen Zellen, obwohl sie - wie oben besprochen - gleichzeitig auch die Virus-clearance steigert (78). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Eustatia et al. (34), die feststellten, daß die Aktivierung mit TM - ebenso wie eine längere Kultivierung der Zellen vor der Infektion in vitro - die Multiplikationsrate der von ihnen getesteten Viren, nämlich des Mengovirus, des VSV und zweier Stämme des MHV steigerte. Die Autoren fanden in ihren Untersuchungen keinen Anhalt für eine Vermehrung des von ihnen getesteten Hvh-1-Stammes. Dies entspricht jedoch unseren Befunden, da ausschließlich C57-bl-Makrophagen verwandt wurden.

Die Vermutung liegt nahe, daß der fördernde Einfluß der TM-Aktivierung auf die Virusvermehrung in vitro auf einer allgemeinen Steigerung des Stoffwechsels beruht, als deren biochemisches Korrelat beispielsweise die eingangs beschriebenen erhöhten Enzymaktivitäten meßbar werden. Insbesondere kommt es zu einer Steigerung der DNA-Synthese, die eine Virussynthese erst möglich macht. Wie diesbezügliche Untersuchungen aus unserem Labor zeigen (86), verfügen die TM-aktivierten Makrophagen tatsächlich über einen größeren Nucleotidpool und synthetisieren mehr DNA als normale Makrophagen.

Aufgrund weiterer Versuche biochemischer Natur in unserem

Labor (137) kann sogar gefolgert werden, daß die Restriktion der Virusvermehrung, die wir in den C57-bl-Makrophagen finden, wiederum auf den Stoffwechsel dieser Zellen zurückzuführen ist, nämlich auf ihren Mangel an energiereichen Phosphaten (137), der sowohl eine geringere Aufnahme infektiöser Partikel als auch eine geringere Synthese der einzelnen Virusbausteine zur Folge hat.

Streng von der unspezifischen Aktivierung der Makrophagen durch TM abzugrenzen, die die Virussynthese - wie wir gesehen haben - nicht unterdrückt sondern steigert, ist die spezifische Aktivierung der Makrophagen durch vorherige Immunisierung der Spendertiere. Solcherart immune Makrophagen sind offenbar in der Lage, die Multiplikation von normalerweise in diesen Zellen vermehrungsfähigen Viren zu reprimieren (78). Wir müssen daraus schließen, daß - trotz morphologisch gleichartiger Veränderungen an der Zelle - die Zellfunktion durch diese Art der immunologischen Aktivierung in grundsätzlich verschiedener Weise beeinflusst wird.

Vergleicht man die normalisierten Wachstumskurven der Fibroblasten der NMRI und C57-bl-Mäuse, so liegt die Vermehrungsrate bei ungefähr gleichen Ausgangswerten in den NMRI-Fibroblasten etwas höher als in den C57-Zellen.

Die einzige Ausnahme macht der Stamm Lennette, für den augenscheinlich zu hohe Ausgangswerte in einigen Versuchen, die wahrscheinlich durch unvollständiges Abwaschen des Inoculums entstanden sind, eine geringere Multiplikationsrate in den NMRI-Fibroblasten vortäuschen.

Ob den Unterschieden hinsichtlich der Vermehrbarkeit der

Herpesviren in den Fibroblasten der beiden Mäusestämme eine Bedeutung zukommt, können wir nicht mit Bestimmtheit sagen. So fand Lopez (91) bei der Untersuchung der Vermehrbbarkeit des Stammes McIntyre (Hvh-1) in den embryonalen Fibroblastenkulturen von AJ-, Balb-c- und C57-bl-Mäusen, die in vivo ein unterschiedliches Resistenzverhalten zeigten, keine Differenzen. Da wir - aus technischen Gründen - nicht immer gleich alte Zellkulturen von beiden Mäusestämmen verwenden konnten, kann auch dieser Faktor unsere Ergebnisse beeinflusst haben, und zwar einmal dadurch, daß ältere Fibroblasten etwa analog zu Kaninchennieren- oder BHK-Zellen das Virus nicht mehr so gut vermehren können, andererseits aber auch durch den in den älteren Zellen nur noch schlecht einstellbaren pH, der zu einer schnelleren Inaktivierung des extrazellulären Virus geführt haben könnte. Mit Ausnahme der Versuche mit dem Stamm L3-2S waren die verwandten C57-Kulturen unglücklicherweise durchschnittlich um 1 bis 2 Tage älter als die der NMRI-Mäuse.

Wie auch bei den Versuchen mit den Makrophagen stellen wir eine etwas geringere Vermehrungstendenz der getesteten Hvh-2-Stämme gegenüber den Typ-1-Viren in den Fibroblasten fest. Wiederum werden die höhere Empfindlichkeit gegenüber der thermischen Inaktivierung, das pH und die schlechtere Vermehrungstendenz der Typ-2-Viren in den Kaninchennierenzellen dieses Ergebnis beeinflusst haben. Der Befund steht aber auch in Übereinstimmung mit dem von Mogensen (100), der die Überstände infizierter Fibroblastenkulturen auf humanen embryonalen Lungenzellen titrierte und eine 19- bis 100-fach höhere Multiplikationsrate für den getesteten Hvh-1-Stamm McIntyre gegenüber dem Hvh-2-Stamm MS fand.

4.2. Der Einfluß von Thioglycollat-Medium auf die i.p.- Infektion mit Hvh-1 und Hvh-2 in der erwachsenen Maus

Nachdem im vorigen Abschnitt der Arbeit das Vermehrungsverhalten der Herpesviren in normalen und stimulierten Makrophagen in vitro diskutiert wurde, beschäftigt sich der folgende Teil der Diskussion mit dem Einfluß der Makrophagen auf die Herpesinfektion in vivo. Als Testsubstanz wendeten wir das TM an, von dem bekannt ist, daß es die Makrophagen unspezifisch stimuliert, und applizierten es intraperitoneal zu verschiedenen Zeitpunkten vor der ebenfalls i.p. erfolgenden Virusinfektion.

Obwohl die i.p.-Inokulationsroute schon unter zahlreichen Aspekten untersucht worden ist, herrscht noch immer keine endgültige Klarheit über den genauen Ausbreitungsweg der Viren im Organismus. Unglücklicherweise haben die meisten Autoren (12, 70, 75, 126, 178) den Verlauf der Infektion in der Säuglingsmaus beschrieben, während sich nur wenige Arbeiten mit dem Ausbreitungsweg der Viren in erwachsenen Tieren beschäftigt haben (127). Wahrscheinlich hat man sich die pathogenetischen Vorgänge bei der i.p.-Infektion folgendermaßen vorzustellen (Siehe Abb. 4.1).

Das in die Peritonealhöhle injizierte Virus dringt durch die Serosa in die Darmwand ein, wo es sich initial vermehrt und Anschluß an das Blut- und Lymphgefäßsystem gewinnt (178). Mit der Vena Portae gelangt es dann in die Leber, während die Milz über den großen Kreislauf erreicht wird. Ebenso ist es denkbar, daß das Virus auf direktem Wege, d.h. durch die viszerale Serosa hindurch in Leber und Milz gelangt. Fluoreszenz-

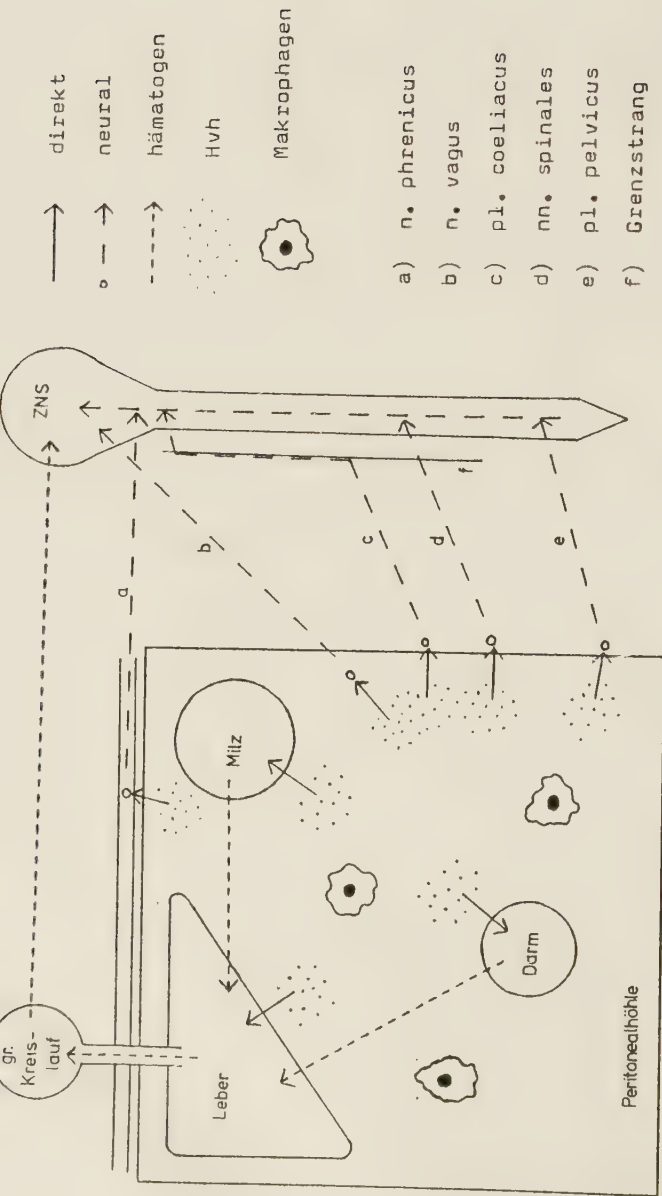


Abb. 4.1 Mögliche Ausbreitungswege der Herpesviren nach intraperitonealer Inokulation

serologische Untersuchungen (127) zeigen Virusantigen an der Serosaoberfläche aller viszerale Organe. Gegen diese Vorstellung spricht nur die Verteilung der Läsionen in der Leber, nämlich fokale Nekrosen um die Gefäße herum (99, 101) anstatt subcorticaler Läsionen, wie man sie bei einer direkten Ausbreitung erwarten würde.

Allerdings hat T.S.L. Beswick (12) solche subcorticalen Herde in der Leber einmal beschrieben. Außerdem sollte man bedenken, daß die Anwesenheit von Virus nicht notwendigerweise ein histologisches Korrelat haben muß und daß umgekehrt zur Entstehung einer Läsion auch noch andere Faktoren in der Regel notwendig sind, wie beispielsweise bestimmte Entzündungszellen hämatogenen Ursprungs, so daß die Verteilung der Nekrosen um die Blutgefäße nicht unbedingt die Herkunft des Virus aus dem Blut impliziert. Somit schließt also eine solche Verteilung der histologischen Läsionen den direkten Weg nicht aus.

Wichtiger als die Frage nach dem Infektionsmodus von Leber und Milz, aber ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, ist die Frage nach dem weiteren Ausbreitungsweg der Viren in das Zentralnervensystem. Die Wanderung entlang der peripheren Nerven als einer der möglichen Mechanismen ist durch zahlreiche Arbeiten gesichert (126, 127, 178, 23). Dennoch ist Johnson (70) der Ansicht, daß die Herpesviren sich bei der i.p. Inoculation zunächst in den viszerale Organen vermehren, eine Virämie erzeugen und dann auf dem Blutweg ins ZNS gelangen. Als Beweis für seine Hypothese sieht er Infektionsherde um die kleinen Hirngefäße an, deren Entstehung er durch einen passiven Transport des Virus durch das Gefäßendothel und damit durch die Blut-Hirn-Schranke erklärt (71). Welche Bedeu-

tung der Blut-Hirnschranke bei der Infektion des ZNS durch die Herpesviren zukommt, ist im Einzelnen noch nicht bekannt. M.I. Sellers (203) hat zu diesem Problem eine interessante Theorie entwickelt. Nach den Ergebnissen ihrer Untersuchungen fordert sie nämlich, daß sich mit dem Heranreifen der Mäuse zu erwachsenen Tieren eine Barriere gegenüber den Herpesviren im ZNS ausbildet in Gestalt der Perizyten oder der Endothelzellen, die die kleinen Hirngefäße umgeben:

Während die Zellen der Säuglingsmäuse die Herpesviren permissiv vermehren und somit die Infektion an das umliegende Nerven- und Gliagewebe weitergeben, findet in den Zellen der adulten Tiere ein non-permissiver Vermehrungszyklus statt, so daß die Viren nicht weiter in das ZNS penetrieren können. Nach dieser Theorie bestünde also bei den adulten Tieren eine funktionstüchtige Blut-Hirn-Schranke, die den hämatogenen Ausbreitungsweg als wenig wahrscheinlich erscheinen läßt.

So vertreten zahlreiche andere Autoren die Ansicht, daß die Erreger bei der i.p.-Inokulationsroute direkten Anschluß an periphere Nervenendigungen erlangen und über das Rückenmark das ZNS erreichen. In der Peritonealhöhle selbst erhält das Virus Anschluß an die vegetativen Geflechte der Plexus coeliacus und pelvici, an die Nervi splanchnici und über das Sonnengeflecht auch an den Nervus vagus. Da das Serosaeepithel offensichtlich kein Hindernis für die Virusausbreitung darstellt, sind auch der Retroperitonealraum mit dem Plexus lumbosacralis, das Zwerchfell (N. phrenicus) und die vordere Bauchwand (Nn. subcostalis, ileohypogastricus, ileoinguinalis) gemeinsam mit der Bauchhöhle als funktionelle Einheit anzusehen. Eine besondere Prädilektion für die Ausbreitung entlang

der peripheren vegetativen Nerven, wie sie Rajcani (127, 185) für das Herpesvirus hominis herausstellte, wurde auch beim Pseudorabiesvirus, einem tierpathogenen Herpesvirus, und beim Vesicular-Stomatitis-Virus, einem anderen neurotrophen Virus (39, 127) beobachtet.

Einer aufsteigenden neuralen Ausbreitung entspricht die zeitliche Aufeinanderfolge nachweisbarer Titer in den einzelnen Abschnitten des ZNS und der von caudal nach cranial abnehmende jeweils maximale Virusgehalt, wobei das Großhirn sowohl am spätesten befallen ist als auch die niedrigsten Werte aufweist (127).

Als Nebenschluß der hämatogenen Ausbreitung wurde auch eine Wanderung entlang den im Mesenterium und im Retroperitoneum gelegenen Lymphbahnen diskutiert.

Wenn auch der endgültige Beweis noch aussteht, daß der hämatogene Ausbreitungsweg ins Gehirn bei den adulten Mäusen durch das Dazwischentreten einer funktionstüchtigen Blut-Hirnschranke gestoppt wird, liegt dennoch die Vermutung nahe, daß dem direkten neuralen - zumindest für die i.p.-Inoculationsroute - die größere Bedeutung zukommt (71, 127). Diese Frage ist deshalb wichtig, weil es von ihrer Beantwortung abhängt, ob wir die viszerale Organe und das ZNS als hintereinandergeschaltetes System - unter der Annahme einer hämatogenen Ausbreitung - oder als parallelgeschaltet - unter der Annahme der neuralen - zu verstehen haben. Yamamoto (178) und Mogensen (100) betonen die Unabhängigkeit der viszerale und der neuralen Beteiligung in ihren Versuchstieren, was im Sinne einer Parallelschaltung zu deuten wäre.

Nach unseren eigenen Beobachtungen bei i.p. Infektion von

NMRI-Mäusen ist das Bild einer ascendierenden Myelitis, die mit einer Parese der Hinterläufe und einer Blasenlähmung beginnt und langsam nach cranial fortschreitet, für den Stamm Len (Hvh-1) sehr deutlich ausgeprägt. Bei dem wesentlich pathogeneren Stamm D-316 (Hvh-2) stehen zentralnervöse Symptome - seien sie Ausdruck einer meningealen Reizung oder einer echten Enzephalitis - dagegen von vornherein im Vordergrund, wobei die ersten Krankheitszeichen aber auch erst zwei bis drei Tage später auftreten. Wie das recht unterschiedliche Erscheinungsbild der Erkrankung, die durch die beiden Stämme hervorgerufen wird, erklärt werden soll, läßt sich nicht sagen. Wir stellen aber fest, daß auch Plummer & Hackett (119) eine höhere Neuropathogenität ihres Typ-2-Stammes MS gegenüber dem Typ-1-Stamm L-2 fanden: Die enzephalitischen Zeichen waren stärker ausgeprägt; wie auch bei unseren Versuchen führte die Hvh-2-Infektion bei einmal manifest erkrankten Tieren nahezu ausnahmslos zum Tod, während sich die mit dem Typ 1 infizierten Tiere zu einem Teil unter Rückbildung der Paresen erholten. Auch für den Stamm D-316 halten wir eine aufsteigende Myelitis und nicht die hämatogene Ausbreitung für am wahrscheinlichsten, da der erste positive Virusbefund im Rückenmark dem im Gehirn in der Regel jeweils um mindestens einen Tag vorausgeht.

Ähnlich wie es von der Infektion mit den Tollwutviren bekannt ist (36), könnte die Invasion des Rückenmarkes durch die Hvh-2-Viren klinisch stumm verlaufen und erst beim Erreichen höherer Zentren zu Krankheitsercheinungen führen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das Vorherrschen enzephalitischer Symptome bei der i.p. Hvh-2-Infektion wäre die, daß diese Viren nicht bereits auf der Höhe der lumbalen bzw.

tieften thorakalen Segmente Anschluß an das RM gewinnen, sondern entlang der peripheren vegetativen Nerven (N. Vagus) nach oben wandern, um erst in Höhe der bulbären Zentren ins ZNS zu gelangen.

In dem Modellfall der intraperitonealen Infektion ist die Interaktion der Viren auf ihrem Weg zu den Zielorganen mit den körpereigenen Abwehrmechanismen von ausschlaggebender Bedeutung. Die Träger der körpereigenen Abwehr in diesem Kompartiment sind in erster Linie die Peritonealmakrophagen, deren Einfluß auf die Herpesinfektion im Weiteren im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stehen wird.

Die Aufgabe der Makrophagen im Sinne einer erfolgreichen Abwehr der Infektion ist es, das Virus auf irgendeine Weise abzufangen und zu vernichten, bevor es sich an die empfänglichen Zielzellen - also an die Zellen des Serosae epithels oder an die peripheren Nervenendigungen - in der Bauchhöhle anlagern kann.

Daraus folgt, daß die Pathogenese der i.p.-Infektion auf mindestens zwei völlig verschiedene Arten beeinflußt werden kann, nämlich einmal durch Mechanismen, die an den Makrophagen angreifen und deren "Killerpotential" in positivem oder negativem Sinn verändern, zum anderen aber auch durch Faktoren, die die Infektiosität der Viren beeinflussen, indem sie diese entweder direkt toxisch schädigen oder aber Rezeptoren blockieren, seien es nun solche an den Viruspartikeln selbst oder seien es diejenigen an den Erfolgsorganen, an die sich das Virus anlagern muß, um weiter in den Organismus vorzudringen.

Die Gabe von Thioglycollat-Medium (TM) führt bei dem Stamm Lennette drei Stunden vor der Infektion zu einer Steigerung, 72 h a.i. zu einer Abschwächung der Mortalität, während für den Stamm D-316 genau die umgekehrten Verhältnisse gelten. Diese Befunde, zusammen mit den Ergebnissen der Zeitkinetik über die Gabe von TM (vgl. Tabelle 3.3, S. 73) legen es nahe, im Wirkungsmechanismus der Substanz einen Kurz- und einen Langzeiteffekt voneinander zu unterscheiden.

1. Der Kurzzeiteffekt (TM 3 h a.i.)

Nach den Angaben aus der Literatur (vgl. Kap. 1.1.3., S. 7 f.) ist es höchst unwahrscheinlich, daß die Einwanderung junger, aktivierter Makrophagen aus dem Knochenmark bei der Gabe der Substanz so kurz vor der Infektion an den entstehenden Effekten maßgeblich beteiligt sein sollte. Stewart et al. (155) berichten über das Auftreten der ersten, zunächst nur ganz sporadischen Precursorzellen erst vier Stunden nach TM-Gabe und sicherlich kann von einer quantitativ faßbaren Zunahme der Makrophagen in den ersten 24 h nicht die Rede sein.

Demnach müssen andere Ursachen in Erwägung gezogen werden, um den Kurzzeiteffekt der Substanz zu erklären:

a) Die Injektion von TM führt zu einer unspezifischen Entzündung des Peritoneums. Olitsky & Schlesinger (117) und Wildy (176) haben festgestellt, daß eine artefizielle Entzündung des subcutanen Bindegewebes durch Terpentin, Äther oder Olivenöl die Ausbreitung von Herpesviren nach subcutaner Inokulation beeinflußt, und zwar in dem Sinne, daß die Neuropathogenität herabgesetzt wird. Sie erklärten dies durch eine Verstopfung der Lymphdrainage, aufgrund derer das Virus schlech-

teren Anschluß an die Nervenendigungen erhielt. Umgekehrt wurde durch die Gabe hypertoner Lösungen eine Verstärkung der Neuropathogenität erzielt, (117, 176, 23) die die Autoren durch das entstehende lokale Ödem, eine Erweiterung und Permeabilitätserhöhung des lymphatischen Gewebes und einen gesteigerten Lymphabfluß erklärten. Voraussetzung für beide Deutungsmöglichkeiten ist die Hypothese, daß das Virus über die Lymphkanäle zu den peripheren Nervenendigungen gelangt.

Es erscheint indessen kaum möglich, diese Befunde für die subcutane Infektion auf die Verhältnisse in der Bauchhöhle zu übertragen, da dem Virus dort im Gegensatz zur Applikation in die Subcutis kein Widerstand durch feste Gewebe entgegengesetzt wird.

b) Im Peritoneum haben sich als erste Reaktion auf den entzündlichen Reiz polymorphkernige Leukozyten angesammelt, (155, 151) die während des ersten Tages nach der TM-Injektion die Hauptmasse der PEC ausmachen. Demnach ist eine Interaktion zwischen diesem Zelltyp und den Viren denkbar. Nahmias et al. (109) und Gönzöl et al. (46) haben das Vermehrungsverhalten von Herpesviren in weißen Blutzellen untersucht. Sie fanden eine Vermehrung um eine Zehnerpotenz, die aber erst am dritten Tag nach der Infektion einsetzte und am fünften Tag ihr Maximum erreichte, zu einem Zeitpunkt also, zu dem die durch die TM-Stimulation angelockten Polymorphkernigen größtenteils schon wieder zugrundegegangen sind (31, 155). Außerdem konnte die Virusmultiplikation nur in Anwesenheit von Phytohämagglutinin stattfinden, was den Schluß nahelegt, daß die für die Vermehrung verantwortlichen Zellen nicht die Polymorphkerni-

gen, sondern die durch Transformation aus den Lymphozyten entstandenen Blasten sind (46). Es ist aber aus der Literatur auch nicht bekannt, daß die TM-Stimulation irgendwelche stimulierenden oder gar transformierenden Einflüsse auf die letztgenannte Zellart hätte, die im Peritonealexsudat ebenfalls vertreten ist.

c) Wie bereits erwähnt, trifft das Virus bei Gabe von TM 3 h a.i. nahezu ausschließlich auf residente Makrophagen. Es gibt keine Angaben darüber, ob die zu diesem Zeitpunkt in der Peritonealhöhle befindlichen alten Makrophagen durch die Anwesenheit der Substanz in ihrer Funktion in irgendeiner Weise alteriert werden. Bereits aus der Inspektion der Tiere zu diesem Zeitpunkt wird jedoch deutlich, daß das TM noch nicht vollständig resorbiert ist. Weiterhin weiß man, daß die Makrophagen diese Substanz phagozytieren: Die Zellen zeigen Vakuolen, die mit unverdaulichem Agar, einem Bestandteil des TM, angefüllt sind (47, 62). Es erscheint demnach denkbar, daß bei der Gabe von TM drei Stunden vor der Infektion die Makrophagen so stark phagozytiert haben, daß sie nicht mehr in der Lage sind, das in die Bauchhöhle inoculierte Virus aufzunehmen und zu vernichten.

Allerdings berichtet MacKay Murray (96), daß die Clearance einer Tracersubstanz durch das RES nur dann verringert wird, wenn die Makrophagen vorher mit einer Substanz von genau denselben Oberflächeneigenschaften abgesättigt worden waren, was im Falle der Phagozytose von TM und der anschließenden Aufnahme von Virus wohl nicht zutrifft. Man wird daher auch eine toxische Komponente des TM für die Makrophagen dis-

kutieren müssen.

d) Da zumindest ein Teil des TM zum Zeitpunkt der Infektion noch vorhanden ist, kann aber auch eine direkte Interaktion zwischen der Substanz und den Viruspartikeln nicht ausgeschlossen werden: Es ist bekannt, daß sulfatierte Polyanionen die Adsorption der Herpesviren hemmen (41, 108), und zwar in unterschiedlichem Ausmaß für die beiden Serotypen; der Typ 2 wird stärker beeinflusst (65, 158, 110). Als Erklärung für dieses Phänomen werden die elektrostatischen Kräfte zwischen den negativ geladenen Polyanionen und den entgegengesetzt geladenen Viria im Sinne einer reversiblen Bildung nicht-infektiöser Komplexe herangezogen. Die beiden am besten untersuchten Substanzen aus der Reihe der sulfatierten Polyanionen sind Heparin und Dextransulfat. Während das Heparin wahrscheinlich ausschließlich die Adsorption beeinflusst, hat DS noch einen zusätzlichen inhibierenden Effekt auf die Plaquebildung (158), was für ein Eingreifen der Substanz in das intrazelluläre Viruswachstum spricht. Takemoto (158), Hutton (65) und Rawls (129) beschreiben außer diesen beiden Substanzen noch eine dritte, den sogenannten "Agarinhibitor" der wie das Heparin wirkt.

Das von uns benutzte Thioglycollat-Medium enthält 0,75 g Agar/l. Dies entspricht größenordnungsmäßig der in der Literatur verwandten Hemmkonzentration von 1,5 g/l (162). Offenbar ist aber auch die Art des verwandten Agars von Bedeutung (129). Ebenso wie die des Heparin (108) ist auch die Wirkung des Agarinhibitor durch Protaminsulfat antagonisierbar.

Außerdem fanden Nahmias et al. (111) in einer Studie

über die Eignung verschiedener Transportmedien für den Versand von Virusproben, daß ein bestimmtes Medium, nämlich das sogenannte "Amies-Medium" besonders stark zur Inaktivierung von Hvh-2-Viren führte (45 %), das neben 4 g Agar/l auch noch 1 g/l Thioglycollat-Reinsubstanz enthielt - gegenüber 0,5 g/l in dem von uns verwandten TM.

Auch eine inaktivierende Wirkung des in dem TM ebenfalls vorhandenen Peptons (15,0 g/l) kann nicht ausgeschlossen werden (162).

Zusammenfassend erscheint es demnach denkbar, daß sich Bestandteile des TM - analog zu dem für das Heparin nachgewiesenen Wirkungsmechanismus - mit den Viruspartikeln zu einem Komplex verbinden und so deren Anlagerung an die Rezeptoren der Zielzellen - in diesem Falle die Zellen des Serosaepithels und die peripheren Nervenendigungen -, also die Adsorption blockieren.

Unter Zuhilfenahme der in c und d genannten Erklärungsmöglichkeiten läßt sich demnach der Kurzzeiteffekt des TM auf die Infektion mit den Stämmen Lennette und D-316 folgendermaßen erklären:

Bei einer Infektion mit dem Stamm Len trifft das Virus auf inaktivierte, mit TM Überladene, vielleicht auch durch die Substanz toxisch geschädigte Makrophagen. Es kann diese Barriere leicht überwinden und gelangt an die Nervenendigungen und an die viszerale Organe, wo es durch eine gesteigerte Vermehrung in Leber und Milz dort zu einem erhöhten Virusgehalt und durch ungehinderte Aufnahme an den Nervenendigungen zu einer verstärkten Neuropathogenität und somit zu einer ge-

steigerten Mortalitätsrate führt.

Der Stamm D-316 (Hvh-2) trifft zwar auf dieselbe geschädigte Makrophagenpopulation, die adsorptionshemmenden Einflüsse der Substanz, für die die Typ-2-Viren bekanntermaßen empfindlicher sind als der Typ 1 (65, 110, 158), gewinnen jedoch das Übergewicht und führen gemeinsam mit den ungünstigen pH-Verhältnissen (Das pH des TM liegt bei 37°C bei $7,1 \pm 0,1$, während das pH-Optimum für den Stamm D-316 bei 8,0 liegt (79)) zu einer Inaktivierung eines großen Teils des Inoculums, bevor das Virus noch in den Organismus eindringen kann: Weniger Virus gelangt sowohl in die viszerale Organe als auch an die peripheren Nervenendigungen; die Gesamtmortalität im Vergleich zu den Kontrolltieren sinkt.

Der Kurzzeiteffekt des TM bei Gabe 3 h a.i. beruht also auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, nämlich auf der Hemmung der Phagozytoseleistung der Makrophagen auf der einen und auf der Hemmung der Adsorption der Herpesviren auf der anderen Seite. Beide Effekte stehen im Gleichgewicht miteinander, wobei offensichtlich spezifische Eigenschaften des jeweiligen Hvh-Stammes den Ausschlag geben, ob die Phagozytosehemmung oder die Adsorptionshemmung bei der Pathogenese der Virus-Wirts-Interaktion überwiegen.

2) Der Langzeiteffekt (TM 72 h a.i.)

Bei der Gabe von TM 72 Stunden vor der Infektion kann man mit großer Sicherheit davon ausgehen, daß in der Bauchhöhle eine Population von stimulierten Makrophagen vorliegt, die sowohl quantitativ vermehrt sind als auch - wie in Kap. 1.1.2. und 1.1.3. beschrieben - cytologische und funktionelle

Veränderungen aufweisen.

Die Befunde über die Interaktion von stimulierten Makrophagen mit intrazellulären Parasiten sind vielfältig. Es erscheint dabei notwendig, die unter dem Oberbegriff "Aktivierung" subsumierten Prozesse erstens einer gesteigerten T-Zell-abhängigen Killertätigkeit, zweitens einer gesteigerten DNA-Synthese, in deren Konsequenz es zu einer gesteigerten Synthese der Erreger kommen kann, und drittens einer Stimulation der Phagozytoseleistung der Makrophagen pathogenetisch voneinander abzugrenzen.

Während die T-Zell-abhängige Aktivierung der Makrophagen an das Ablaufen einer spezifischen zellulären Immunreaktion gebunden ist, handelt es sich bei den an zweiter und dritter Stelle genannten Vorgängen um solche, die - wie in Kap. 4.1. besprochen - in den unspezifisch, z.B. durch TM stimulierten Makrophagen ablaufen können.

Mackaness (96) stellte fest, daß während einer Infektion von Mäusen mit Listerien oder Brucellen die durch die Bakterien aktivierten Makrophagen das Wachstum des auslösenden, aber auch des anderen Bakteriums unterdrücken konnten, und daß somit eine zwar spezifisch-immunologisch induzierte, aber in der Wirkung unspezifische Aktivierung vorlag. Ein Beispiel für eine im echten Sinne spezifische Aktivierung gaben Tompkins et al. (159), indem sie zeigten, daß sich Vacciniaviren in normalen Makrophagen vermehren konnten, während ihre Vermehrung in immunen Zellen reprimiert war. Dagegen fand W.H. Wagner (187) daß sich Mykobakterien in vitro sowohl in den Makrophagen immunisierter als auch unspezifisch stimulierter Mäuse vermehren konnten, nur in den in der Bauchhöhle befind-

lichen Makrophagen vaccinierter Tiere taten sie das nicht. Diese nur unter in-vivo-Bedingungen auftretende Restriktion schrieb er der Freisetzung von Zellmediatoren immunkompetenter T-Zellen zu.

Glasgow (44) gelang es, Mäuse durch den Transfer TM-stimulierter Makrophagen gegen eine Infektion mit dem Semliki-Forest- oder dem Enzephalomyocarditis-Virus zu schützen, nachdem er diese Zellen aber in vitro durch die Exposition gegenüber einem nicht-replizierenden Virus zur Interferonproduktion angeregt hatte. TM-aktivierte Makrophagen, die er nicht dieser in-vitro-Prozedur unterzogen hatte, blieben dagegen wirkungslos.

Untersuchungen von Sethi et al. (148) haben hingegen erwiesen, daß sich Toxoplasmen in TM-stimulierten Makrophagen nicht so gut vermehren konnten wie in normalen: Es wurden mehr Parasiten inaktiviert (80 % gegenüber 20 % in normalen), und die Verzögerungsphase vor dem ersten Vermehrungszyklus war prolongiert. Es bestand darüberhinaus aber noch eine T-Zell-abhängige spezifische Stimulierbarkeit der Makrophagen, die zu einer Abnahme desjenigen Anteils an Zellen führte, in denen sich die Toxoplasmen vermehren konnten.

Während bei den bis jetzt geschilderten Untersuchungen immer auch noch andere Faktoren an der gesteigerten Infektabwehr Anteil hatten, gibt es ein Oncornavirussystem, in dem durch die Vorbehandlung mit TM allein eine Erkrankung verhindert werden kann: Die intraperitoneale Applikation der Substanz zwei Tage vor der Infektion mit dem Friend-Leukämievirus kann die Entstehung von Leukämien in Mäusen erheblich reduzieren (156). Biochemisch fand man in den stimulierten

Zellen eine gesteigerte Aktivität der Peroxidase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die die Autoren sozusagen als "Indikator" einer gesteigerten Makrophagenaktivität in Zusammenhang mit der protektiven Wirkung des TM brachten. Darüberhinaus stellten sie weiter fest, daß durch diese Vorbehandlung die durch das Virus hervorgerufene Immunsuppression zumindest zum großen Teil aufgehoben wurde: FLV-infizierten Mäusen mit und ohne Vorbehandlung mit TM und unbehandelten Kontrollen wurde i.p. eine Suspension sensibilisierter Schaferythrozyten verabreicht. Vier Tage später konnten in den Milzen der TM-behandelten infizierten Mäuse zehn mal mehr antikörperbildende Zellen nachgewiesen werden als in denen der nicht vorbehandelten virusinfizierten Tiere. In den Milzen der ausschließlich mit TM behandelten Tiere fanden sich nur halb so viele antikörperproduzierende Zellen wie in denen der nicht vorbehandelten und nicht infizierten Kontrollen.

Man kann sich diese Beobachtung wohl so erklären, daß die durch das TM stimulierten Makrophagen einen Teil des Antigens, nämlich der sensibilisierten Schaferythrozyten, durch Phagozytose aufgenommen haben, bevor sie mit den Antikörperproduzierenden Zellen in der Milz in Kontakt kommen konnten.

Wie sich weiterhin zeigte, wirkt das TM sowohl gegen das Virus als auch gegen die frisch transformierten Tumorzellen (77, 156).

Der Einfluß von Makrophagen-aktivierenden Substanzen auf die Pathogenese speziell der Herpesinfektion ist nur anhand weniger Arbeiten untersucht worden: Larson et al. (80) stellten fest, daß eine i.v. Vorbehandlung von Kaninchen mit BCG vor der cornealen oder vaginalen Infektion mit Herpesviren

zwar nicht die Häufigkeit der Enzephalitiden, wohl aber den Anteil ihrer letalen Ausgänge signifikant vermindern konnte. Die Ursache dieser protektiven Wirkung blieb aber weitgehend ungeklärt; eine verstärkte Bildung lokaler Antikörper im Gehirn wurde diskutiert.

Dagegen konnte durch eine vorherige BCG-Impfung kein Schutz gegenüber dem onkogenen Herpesvirus saimirii erzeugt werden, das in kleinen Affen maligne Lymphome erzeugt (143).

In jüngerer Zeit konnten Kirchner et al. (198) einen protektiven Effekt bei der Gabe von *Corynebacterium parvum* acht Tage vor der Infektion mit Herpesviren nachweisen. Die Anzahl letal verlaufender Enzephalitiden wurde signifikant gesenkt. Auch Mäuse, deren Immunsystem durch Cyclophosphamid supprimiert worden war, konnten durch *C. parvum* geschützt werden.

Beide Agentien, sowohl das BCG als auch die *Corynebakterien*, haben als allgemeine "Immunstimulantien" (102, 198) ein breites Spektrum möglicher Angriffspunkte, das sich nicht auf die Makrophagen beschränkt. Es erscheint daher durchaus möglich, ist aber letztendlich nicht bewiesen, daß die stimulierten Makrophagen den beschriebenen protektiven Effekt gegenüber den Herpesviren hervorgerufen haben.

Aufgrund der eben geschilderten Untersuchungen, aber auch der Makrophagentransferversuche von Hirsch et al. (63), durch die sie Säuglingsmäuse vor einer Infektion mit Hvh-1 schützen konnten, hatten wir bei der Gabe von TM 72 h vor der Infektion an junge adulte Mäuse ebenfalls einen protektiven Effekt erwartet.

- 132 -

Dieser tritt im Falle einer Infektion mit dem Stamm Lennette (Hvh-1) auch tatsächlich ein. Die in die Bauchhöhle eingedrungenen Viren werden offenbar von den aktivierten Makrophagen in erhöhtem Maße aufgenommen und zerstört, so daß die Virusausbreitung in der Bauchhöhle gestoppt oder zumindest unterdrückt wird. Vielleicht kommt auch dem - wie man in Analogie zu der Protease-Pepton-Aktivierung annehmen kann - von den TM-stimulierten Zellen in größerer Menge produzierten Interferon eine nicht unwichtige Rolle zu. Weniger Virus gelangt an die Rezeptoren der primäraffinen Organe und an die Nervenendigungen, die Lähmungen sind weniger ausgeprägt und die Mortalitäts- bzw. Morbiditätsraten sind geringer.

Wenn wir aber auch in der unterschiedlichen Interaktion des TM mit den Makrophagen auf der einen und des TM mit den Viren selbst auf der anderen Seite eine einigermaßen befriedigende Erklärung für den reziproken Kurzzeiteffekt der Substanz auf die beiden Stämme Lennette (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2) gefunden haben, bleibt es unter der oben genannten Hypothese einer besseren antiviralen Wirksamkeit der stimulierten Makrophagenpopulation als Erklärungsmöglichkeit für den Langzeiteffekt dennoch zunächst unverständlich, warum wir bei einer Gabe von TM 72 hr vor der Infektion eine Verstärkung der Pathogenität des Stammes D-316 beobachten.

Unseren eigenen in-vitro-Befunden zufolge können wir für diesen Effekt sicherlich nicht eine erhöhte Vermehrungsfähigkeit dieses Typ-2-Stammes in den Makrophagen verantwortlich machen (Vgl. Kap. 4.1.). Es gibt jedoch Untersuchungen aus unserem Labor, die zeigen (86, 137), daß der Stamm D-316 die Makrophagen in anderer Weise stärker schädigt als der Stamm

Lennette: So ist nach einer Infektion mit dem Stamm D-316 die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen für sensibilisierte Schaf-erythrozyten stärker herabgesetzt als nach der Infektion mit dem Typ-1-Stamm Len. Ebenso wurde beobachtet, daß der Stamm D-316 die RNA-Synthese der Makrophagen anscheinend ebenfalls stärker beeinträchtigt als der Stamm Lennette, wobei dies experimentell noch nicht im Einzelnen geklärt ist.

Es erscheint daher möglich, diese Eigenschaften des Stammes D-316 unter dem Oberbegriff einer verstärkten Zelltoxizität zusammenzufassen. Die Zytotoxizität eines Virus ist eine von der Vermehrungsrate weitgehend unabhängige Qualität, die sich vornehmlich in einer Störung der Morphologie und der Funktion der Zelle zeigt (52). Allerdings ist dieses Phänomen bisher nur bei sehr hohen Viruskonzentrationen und nur ungenau beschrieben worden (52). Es ist aber nach unseren Versuchen denkbar, daß eben diese hohe Toxizität des Stammes D-316 zu einem Zusammenbrechen der digestiven und inaktivierenden Funktionen der Makrophagen führt. Gelingt es trotzdem nur einem ganz kleinen Teil der Viren, sich in den Makrophagen zu vermehren, so findet eine langsame Ausbreitung der Infektion sogar mit den funktionell toten Makrophagen als Vehikel in die viszerale Organe und an die Nervenendigungen statt. Solche Vorgänge würden erklären, warum das Vorhandensein stimulierter Makrophagen in der Bauchhöhle beim Stamm D-316 zu einer Exazerbation der Infektion über die Mortalität der Viruskontrollen hinaus führt, da dann mehr Vehikel für das Virus im Peritoneum zur Verfügung stünden.

Bereits Garabedian & Syverton haben vermutet, daß herpesinfizierte Makrophagen, je nach dem Schicksal, welches das

Virus intrazellulär erleidet, einmal zur Eingrenzung und Sanierung, zum anderen aber auch zur Disseminierung der Infektion beitragen können (43). Eine ähnliche Meinung, nämlich die, daß bestimmte Hvh-2-Stämme von den Makrophagen weniger gut zerstört werden können als die Typ-1-Viren und so diese Barriere überwinden, äußerten auch Renis et al. (132) sowie Mogensen (100), auf dessen Arbeit an anderer Stelle noch ausführlicher eingegangen werden soll.

Wir müssen daher davon ausgehen, daß es - mindestens - zwei Gruppen innerhalb des Herpesvirus hominis gibt, die sich bezüglich ihres Verhaltens in den Makrophagen grundsätzlich voneinander unterscheiden: Während die einen (Prototyp Lenette) von den Makrophagen aufgenommen und inaktiviert werden können, entkommen die anderen (Prototyp D-316) - auf welche Art auch immer - der intrazellulären Zerstörung und bedienen sich möglicherweise der Makrophagen sogar als Vehikel auf ihrem weiteren Weg zu den empfänglichen Organen im Organismus. Anders ausgedrückt bedeutet dies: Der intrazelluläre "Kampf" zwischen den verdauenden und virusinaktivierenden Kräften der phagozytierenden Zelle auf der einen und den zellzerstörenden und expansiven Kräften des Virus auf der anderen Seite wird im einen Fall zugunsten der Makrophagen, im anderen Fall aber zugunsten des Virusstammes entschieden (98).

Unsere Arbeitshypothese liefert retrospektiv auch noch eine zusätzliche Erklärung für den Kurzzeiteffekt des TM bei der Infektion mit dem Stamm D-316 über die adsorptionshemmende Wirkung der Substanz auf die Viren hinaus: Treffen nämlich die Erreger auf die durch die TM-Gabe kurz vorher lädierten, überladenen Makrophagen, so können diese das Virus nicht auf-

nehmen und fallen daher auch in ihrer Carrierfunktion aus, was wiederum zur Eingrenzung der Infektion beitragen würde.

Die entgegengesetzten Resultate, wie wir sie bei den Stämmen Lennette und D-316 unter TM-Vorbehandlung finden, legen eine Parallele zu den widersprüchlichen Befunden von Zisman et al. (179) und DuBuy (30) bei der Gabe von Silikat zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Infektion mit zwei verschiedenen Hvh-1-Stämmen nahe: Während die eine Arbeitsgruppe die in beiden Fällen auftretende Erhöhung der Mortalität bei einer Gabe der Substanz 2 h a.i. mit einer Zerstörung der Makrophagen erklärte (179), machte der andere Autor, der das Silikat 24 h a.i. gab, die Vermehrung der Makrophagen in der Bauchhöhle als Ausdruck der stimulierenden Wirkung der Substanz, die er zu diesem Zeitpunkt nachweisen konnte, für die Pathogenitätssteigerung verantwortlich. Da Zisman et al. mit Antimakrophagenserum genau dieselben Effekte erzielten wie mit Silikat, und da außerdem die Zeit zwischen der Silikatinjektion und der Virusinfektion, nämlich zwei Stunden, für die Ausbildung des Stimulationseffektes sicher zu knapp bemessen ist, kann man nicht daran zweifeln, daß die Steigerung der Mortalitätsrate in dieser Versuchsanordnung tatsächlich auf einer Zerstörung der Makrophagen beruhte. Somit wären die Befunde von Zisman et al. mit dem Kurzzeiteffekt des TM für den Stamm Lennette in Beziehung zu setzen, während DuBuis Befunde mit dem Langzeiteffekt des TM gegenüber D-316 in Übereinstimmung stünden.

Diese Analogie macht aber bereits deutlich, daß die von uns postulierten zwei Gruppen von Herpesviren nicht mit den beiden Serotypen Hvh-1 und Hvh-2 identisch sein können, da

- 130 -

die beiden von Zisman et al. und DuBuy getesteten Stämme beide zum Typ 1 gehörten. Auch bei unseren eigenen Untersuchungen haben wir zwar noch je einen anderen Stamm des jeweiligen Typs festgestellt, der sich bezüglich der TM-Vorbehandlung genauso verhielt wie der entsprechende Prototyp (L3-2S wie Lennette, beide Hvh-1; DD wie D-316, beide Hvh-2). Mit dem Stamm Thea, der serologisch zum Typ 1 gehört, kamen wir jedoch zu Ergebnissen, die eher denen mit dem Stamm D-316 gleichen (19). Aller Wahrscheinlichkeit nach stellt demnach die von uns beobachtete unterschiedliche Zytotoxizität der Herpesviren gegenüber den Makrophagen keine typenspezifische biologische Markereigenschaft dar, sondern eine stammspezifische Qualität.

Sicherlich bleiben unter unserer Arbeitshypothese einige wichtige Fragenkomplexe noch ungeklärt:

Wir stellen fest, daß keine Parallele zwischen dem Vermehrungsverhalten der Viren in den Makrophagen, wie wir es in vitro getestet haben (siehe Kap. 4.1.), und der Pathogenität der Viren nach i.p.-Inokulation in vivo besteht: Der Stamm Len vermehrt sich in den Makrophagen in vitro gut, zeigt aber eine herabgesetzte Pathogenität nach TM-Stimulation 72 h a.i. in vivo, während für den Stamm D-316 das Umgekehrte gilt.

Dennoch scheint uns die Schlußfolgerung voreilig, daß der Interaktion der Viren mit den Makrophagen in vivo keine Bedeutung hinsichtlich des Verlaufs der Infektion zukommt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß andere in vitro meßbare Faktoren als das von uns getestete Vermehrungsverhalten der Viren in den Makrophagen, die wir unter dem Begriff einer er-

höhten Zytotoxizität gegenüber diesen Zellen zusammengefaßt haben (Siehe S. 199), wie zum Beispiel die Erniedrigung der Phagozytoseleistung oder die Supprimierung der Synthese der Zell-RNA, für die Interaktion der Viren mit den Makrophagen in vivo von größerer Wichtigkeit sind. Dies würde erklären, warum der Stamm D-316, obwohl er sich in den Makrophagen in vitro nur sehr gering vermehrt, in vivo - eben aufgrund seiner höheren Zytotoxizität - weit weniger gut von den aktivierten Makrophagen inaktivierbar und damit "pathogener" ist als der Stamm Lennette.

Wir sollten bei unserer Betrachtung auch nicht außer acht lassen, daß gegenüber den Verhältnissen in der Petrischale (Virus im Überschuß) die Relation von Viren zu Makrophagen in der Bauchhöhle wahrscheinlich genau umgekehrt ist (Makrophagen im Überschuß). Daher spielt die in begrenztem Maße bessere Vermehrung des Stammes Lennette in den Makrophagen in vivo wahrscheinlich keine Rolle, da der größte Teil des Inoculums von den Makrophagen sofort inaktiviert werden kann. Nimmt man dagegen für Herpesviren der Kategorie des Stammes D-316 eine höhere Cytotoxizität und damit einen Defekt der Inaktivierbarkeit durch die Makrophagen an, so bleibt auch bei einer geringeren Vermehrbarkeit ein größerer Teil des Inoculums erhalten, und die Infektion schreitet fort.

Hinzu kommt, daß - wie bereits in 4.1. dargestellt - an der gemessenen nur sehr schwachen Vermehrbarkeit der Typ-2-Stämme in vitro wahrscheinlich auch zu einem nicht geringen Anteil unser Versuchssystem selbst einschließlich der verwandten Referenzzellen beteiligt war. Nach den mit biochemischen Methoden in unserem Labor gewonnenen Befunden (137) ist

an einer Vermehrung des Stammes D-316 in den Makrophagen der NMRI-Mäuse kein Zweifel.

Es ist daher besonders interessant, daß Mogensen (100) unter Benutzung eines anderen in-vitro-Systems zu Ergebnissen kam, die mit unseren in-vivo-Befunden sehr gut in Einklang zu bringen sind: Er überschichtete herpesinfizierte Makrophagen mit einem Monolayer aus humanen embryonalen Lungenzellen oder Mäusefibroblasten und inkubierte die Petrischalen für mehrere Tage. Dabei konnte er beobachten, daß die Makrophagen, die er mit dem Hvh-2-Stamm MS infiziert hatte, die Virusausbreitung weit weniger gut begrenzen konnten als solche, die mit dem Hvh-1-Stamm Mc-Intyre (= Lennette) infiziert worden waren. Durch den Stamm MS entstanden große Plaques, die sich auch noch nach zwei Tagen weiter vergrößerten, während die McIntyre-Plaques klein blieben und nach 48 h sogar eine Tendenz zur Rückbildung zeigten. Mogensen beschrieb folglich den Charakter des Stammes McIntyre als "self limiting" und des Stammes MS demgegenüber als "non self limiting". (Leider wurde in der genannten Arbeit (100) die Plaquemorphologie der beiden Virusstämme auf reinen Fibroblastenkulturen nicht untersucht. Es ist daher nicht auszuschließen, daß bereits dort, wie es von anderen Zellkultursystemen bekannt ist (92, 135, 165), eine Differenz in der Größe der Plaques bestanden hat, und zwar völlig unabhängig von der Wirkung der Makrophagen.)

Wir haben unsere Stämme Lennette und D-316 in einem solchen System noch nicht getestet. Würde sich hierbei eine Analogie zu dem Verhalten der beiden von Mogensen untersuchten Stämme ergeben in dem Sinne, daß sich unser Stamm Len als "self limiting", der Stamm D-316 aber als "non self limiting"

erwiese, so wäre dies der in-vitro-Beweis für die Richtigkeit unserer Hypothese einer höheren Makrophagentoxizität des Stammes D-316 in vivo.

Da Mogensen annahm (100), daß Viren, die die Makrophagenbarriere in vitro Überwinden können wie der Stamm MS, in vivo ein ähnlich invasives Verhalten zeigten, verknüpfte Mogensen den "non-self-limiting-Charakter" seines Stammes MS mit dessen Eigenschaft, Lebernekrosen zu bilden und hielt ihn daher für ein typenspezifisches Merkmal der Hvh-2-Stämme. In einer anderen Arbeit (99) liefert er jedoch selbst einen Hinweis, der diese Theorie nicht sehr wahrscheinlich erscheinen läßt, indem er berichtet, daß bereits Säuglingsmäuse im Alter von sieben Tagen keine Lebernekrosen nach einer letalen Hvh-1-Infektion ausbilden. Wäre nämlich die höhere Toxizität gegenüber den Makrophagen adulter Tiere als besonderes Merkmal der Typ-2-Stämme für die Entstehung der Lebernekrosen verantwortlich, so hätten sich bei dem unreifen Zustand der Makrophagen in den Babymäusen dieselben Nekrosen hier auch nach Infektion mit Typ-1-Viren entwickeln müssen.

Bei unseren Untersuchungen haben wir nach der Infektion mit dem Stamm Lennette (Hvh-1) keine, nach Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2) nur ganz sporadisch Lebernekrosen gesehen. Wenn man auch eine Abnahme der Leberpathogenität des Stammes D-316 während seiner Passagierung in Kaninchanchenzellen nicht ausschließen kann, so sollte man diesen Befund dennoch nicht allein als Verlust einer biologischen Markereigenschaft interpretieren. Vielmehr ist seit kurzer Zeit bekannt, daß bei den NMRI-Mäusen nach der Infektion mit zahlreichen Hvh-2-Viren Lebernekrosen regelmäßig nur bis zu einem Alter

von drei bis vier Wochen, danach jedoch nur noch ganz selten auftreten (99). Da wir die Mäuse in einem Alter von vier bis fünf Wochen in unseren Versuchen verwandten, ist es nicht verwunderlich, daß wir solche Läsionen nur an einem kleinen Teil der Tiere beobachten konnten.

Nimmt man an, daß das TM ausschließlich an der Makrophagenbarriere angreift, so sollte der Virusgehalt in den primär-affinen Organen Leber und Milz die jeweiligen Effekte bei Gabe von TM 3 h und 72 h a.i. gegenüber der Viruskontrolle deutlich widerspiegeln. Tatsächlich finden wir auch bei dem Stamm Lennette Unterschiede in den Titern der parenchymatösen Organe, die mit der Morbidität in den einzelnen Gruppen in Übereinstimmung stehen. Bei dem Stamm D-316 sind dagegen die Ergebnisse in Leber und Milz uneinheitlich, wir können weder konstant höhere Titer noch eine längere Persistenz positiver Befunde in der mit TM 72 h a.i. vorbehandelten Gruppe nachweisen. Erst im Rückenmark und im Gehirn sind die Unterschiede zwischen den drei Gruppen klar erkennbar.

Es ist daher nicht auszuschließen, daß das TM - entgegen der aufgestellten Arbeitshypothese - erst zu einem Stadium der Infektion in die Pathogenese eingreift, das nach den primär-affinen Organen und damit auch hinter der Makrophagenbarriere liegt. Dennoch halten wir das Fehlen eindeutiger Unterschiede im Virusgehalt von Leber und Milz zwischen unseren Versuchsgruppen bei der Infektion mit dem Stamm D-316 angesichts der mannigfachen Störfaktoren wie Temperaturschwankungen beim Einfrieren, Auftauen und Verarbeiten der Proben, das saure pH und die Anwesenheit virustoxischer Substanzen in den

Organsuspensionen bei der hohen Empfindlichkeit der Typ-2-Stämme nicht für ausreichend, um unsere Arbeitshypothese einer direkten Interaktion des TM mit den Makrophagen in der Bauchhöhle zurückzuweisen. Es wäre in diesem Zusammenhang sicherlich interessant zu klären, ob bei der Wahl eines anderen Applikationsweges für das TM, beispielsweise des intravenösen, ähnliche Effekte auftreten wie bei dem von uns gewählten intraperitonealen.

Wenn man - im Sinne unserer Arbeitshypothese - davon ausgeht, daß diejenige Gruppe von Herpesviren, zu der der von uns getestete Stamm D-316, aber auch der in der Literatur beschriebene Stamm MS (100) gehören, eine so hohe Toxizität gegenüber den Makrophagen besitzt, daß diese Zellen die Virusausbreitung nicht verhindern können oder vielleicht sogar selbst als Vehikel dienen, so bereitet die Interpretation der Befunde von Morahan et al. (102) Schwierigkeiten, nach denen die i.p. Gabe von Silikat 2 h a.i. die Pathogenität des Stammes MS (2×10^3 pfu/Tier) verstärkt. Man hätte erwarten müssen, daß die Ausschaltung der ohnehin insuffizienten Makrophagenbarriere ohne Effekt auf die Infektion bleibt. Im Gegensatz dazu fanden die Autoren einen höheren Virusgehalt in den Organen und eine schnellere Ausbildung der Enzephalitis. Die Verstärkung der Pathogenität des Stammes MS unter Silikatvorbehandlung 2 h a.i. spricht möglicherweise doch für einen protektiven Einfluß der Makrophagen auch bei der Infektion mit diesen Virusstämmen.

Obwohl dieser gewichtige Einwand gegen unsere Arbeitshypothese letztlich ungeklärt bleibt, erscheinen die Befunde

in der Literatur über die Effekte des Silikats so uneinheitlich und vom jeweiligen System abhängig, daß wir diese Unstimmigkeiten nicht überbewerten sollten. Denn andererseits berichten die Autoren (102), daß die Silikatvorbehandlung 2 h a.i. die protektive Wirksamkeit von Corynebacterium acnes und parvum und von Pyran nicht beeinflußt, also Substanzen, die alle zu einer Stimulation der Makrophagen im Peritoneum führen. (Silikat-vorbehandelte Tiere sind mit denselben Dosen von Corynebakterien und Pyran suffizient geschützt wie unvorbehandelte Tiere). Während die Autoren hieraus den Schluß zogen, daß die genannten Immunmodulatoren in diesem Falle doch an einer anderen Stelle in den Infektionsablauf eingreifen, könnte dieser Tatbestand auch dahingehend gedeutet werden, daß die Wirkungen des Silikat in vivo komplexer sind als bisher angenommen. Es wäre sicherlich sinnvoll, die beiden Effekte der Substanz auf die Makrophagen, nämlich den akut zerstörenden (2 h) und den später aktivierenden (24 h) einer noch umfassenderen experimentellen Prüfung zu unterziehen.

Außerdem sollte man bedenken, daß ein und derselbe Virusstamm, wenn er in verschiedenen Laboratorien unterschiedlichen Passage- und Kulturbedingungen unterliegt, einen Wandel in zahlreichen seiner Eigenschaften, also auch in seiner Pathogenität durchmachen kann (106). Demzufolge sind Ergebnisse aus zwei verschiedenen Forschungsstätten (100, 102) nicht in jedem Fall miteinander zu vergleichen.

Bei unserer Betrachtung haben wir uns darauf beschränkt, die Peritonealmakrophagen als ein abgeschlossenes Kompartiment des RES anzusehen. Vernon-Roberts (168) konnte jedoch

die Auswanderung injizierter markierter Donor-Makrophagen zu extraperitoneal gelegenen Entzündungsherden in den Rezipienten-Mäusen nachweisen. Der Turnover der Peritonealmakrophagen erscheint insgesamt noch zu wenig untersucht, um Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit diese Zellen mit anderen Populationen des RES in Verbindung stehen, sei es direkt durch Wanderung der Zellen durch die Serosa in die viszerale Organe hinein und damit zu den fixen Makrophagen in Leber und Milz oder aber durch ein "Recycling" infizierter Zellen ins Blut und damit dann auch in die weiter entfernten Organe, beispielsweise das ZNS. Das etwaige "Recycling" der Peritonealmakrophagen wäre auch dahingehend untersuchenswert, als geklärt werden könnte, inwieweit die Stimulation einer bestimmten Makrophagenpopulation wie in unserem Falle die der Bauchhöhle auch andere Makrophagen, etwa die im ZNS beeinflußt, die nach Untersuchungen von Fujita & Kitamura (42) und Baldwin (10) ein eigenes, von der Microglia unabhängiges, von den Blutmonozyten abstammendes System darstellen, das bei experimentell erzeugten viralen Enzephalitiden in Aktion tritt.

In den frühen Untersuchungen von Goodpasture (51), aber auch in den späteren von Yamamoto (178) und Rajcani (126, 127) sind immer wieder mononukleäre Infiltrate im entzündlich befallenen Gewebe des ZNS beschrieben worden; Cook & Stevens (23) fanden jedoch in den entzündlichen Infiltraten im ZNS nach der Injektion von Herpesviren virale Produkte nur in den Fibroblasten und zu einem kleinen Teil auch in den Lymphozyten, nicht aber in den Makrophagen. Nach diesen Befunden ist es unwahrscheinlich, daß die ortsständigen Makrophagen zu der Pathogenese der Herpesinfektion im ZNS Wesentliches beitragen.

4.3. Die unterschiedliche Resistenz der NMRI- und C57-bl-Mäuse gegenüber der Infektion mit Hvh-1 und Hvh-2

Nach intraperitonealer Inokulation erwiesen sich vier bis fünf Wochen alte C57-bl-6-Mäuse als wesentlich resistenter gegen die Herpesinfektion als gleichaltrige NMRI-Mäuse. Vergleichstitrationen haben ergeben, daß bezüglich der i.p. ID-50 bei Infektion mit dem Stamm Len (Hvh-1) zwischen den NMRI und den C57-bl-Mäusen eine Differenz von mehr als 1.6, bei Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2) eine Differenz von mehr als 2.8 log-Stufen bestand. Auch mit unverdünntem Virus war bei den C57-Mäusen in beiden Fällen die ID 50 nicht zu erreichen.

Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die frühen Befunde von Lopez (91), der für alle von ihm getesteten Typ-1-Stämme bei intraperitonealer Inokulation eine 100 %ige Resistenz der C57-Mäuse fand, die er in einem Alter von drei bis vier Monaten für seine Untersuchungen verwandte. Rückkreuzungsversuche haben ergeben, daß diese Resistenz als dominantes Merkmal der C57-Mäuse genetisch verankert ist, wobei aber mindestens drei Gene den Erbgang bestimmen. Es besteht offenbar keine Bindung an das Histokompatibilitätsantigen, den H2-Komplex.

Wie bereits in Kap. 1.4. der Einleitung ausgeführt, kann die genetische Resistenz auf mehreren Ebenen des Organismus verankert sein: Erstens kann eine genetische Resistenz auf der Ebene der Einzelzelle bestehen. Diese kann einerseits dadurch zustandekommen, daß die Körperzellen keine oder nur sehr wenige Rezeptoren für ein Virus besitzen (z.B.: Nicht-Primatenzellen besitzen keine oder nur sehr wenige Rezeptoren für Po-

lioviren (98)). Andererseits ist aber von den Bakteriophagen auch das Phänomen der Restriktion bekannt, das darin begründet liegt, daß die Bakterien nur nicht-infektiöse Partikel synthetisieren (188), daß also das Virus in der Wirtszelle einem abortiven Zyklus unterliegt. Aurelian & Roizman (8) berichten über ein derartiges Phänomen beim Verhalten von Herpesviren in Hundenierenzellen.

Zweitens kann eine genetische Resistenz auch dadurch vermittelt werden, daß im Organismus der resistenten Tiere eine Barriere vorhanden ist, die besonders empfängliche Organe vor dem Eindringen des Virus schützt. Diese Barriere kann einmal bereits am Eintrittsort der Viren in den Wirt liegen. Bei der i.p. Inokulation wird sie im Falle der MHV- und - mit Einschränkungen - auch einiger Arbovirusinfektionen durch die Makrophagen verkörpert. Es ist aber ebenso denkbar, daß andere im Peritoneum vorhandene Zellen, wie etwa die Lymphozyten, eine ähnliche "Monitorfunktion" (204) ausüben können. Die Barriere kann aber auch direkt vor oder im Erfolgsorgan der Virusinfektion liegen. Bei der Infektion mit einem neurotrophen Virus wäre es demnach auch möglich, daß das Funktionieren der Blut-Hirn-Schranke oder eine Population virusvernichtender Zellen im ZNS selbst die genetische Resistenz bestimmen.

Die dritte Form einer genetischen Resistenz besteht darin, daß die Zellen resistenter Tiere humorale Mediatoren produzieren, die entweder direkt toxisch auf das Virus wirken oder aber die Vermehrung des Virus in den Zellen blockieren, wie beispielsweise das Interferon. Uns ist allerdings kein Erreger-Wirts-System bekannt, in dem durch solche Faktoren alleine eine genetische Resistenz verwirklicht ist.

Der vierte Typ der genetischen Resistenz manifestiert sich schließlich auf dem Niveau des Gesamtorganismus, also in Form immunologischer Vorgänge. Als Stellvertreter dieser Art seien die genetischen Resistenzen der C57-bl-Mäuse gegenüber der Ectromelie und der lymphozytären Choriomeningitis genannt, die aber beide wiederum auf gänzlich verschiedenen Mechanismen beruhen. Während nämlich die erste durch einen schnellen Antikörperpeak im Ablauf der Infektion im Vergleich zu den suszeptiblen Stämmen hervorgerufen wird, ist die zweite gerade die Folge einer schwächeren Immunantwort und damit der Vermeidung viraler Sekundärschäden in den Black-Mäusen. (144, 145, 2, 3, 160).

Welche der obengenannten Mechanismen sind für die genetische Resistenz der C57-bl-Mäuse gegenüber der Herpesinfektion verantwortlich? Wie bereits eingangs erwähnt, wird die Resistenz gegenüber dem Hvh auf drei voneinander unabhängigen Genorten vererbt. Bereits diese Tatsache macht die Annahme wahrscheinlich, daß es sich bei dem hier vorliegenden Modell um ein multifaktorielles System handeln wird, von dem wir einige Aspekte im Folgenden aufzuspüren versuchen.

Auf der Suche nach den Ursachen für das unterschiedliche Verhalten unserer beiden Mäusestämme bildete die Parallele zwischen der Multiplikationsrate der Viren in den Makrophagen in vitro und der unterschiedlichen in-vivo-Resistenz der NMR1- und C57-Mäuse den Ausgangspunkt unserer Überlegungen.

Durch die vergleichende Untersuchung des Vermehrungsverhaltens der Herpesviren in den Fibroblastenkulturen beider Mäusestämme, bei der sich keine signifikanten Differenzen er-

gaben, hatten wir ausgeschlossen, daß es sich bei dem beobachteten Phänomen der Resistenz der C57-Makrophagen nur um eine Folge einer generalisierten Nicht-Empfänglichkeit aller somatischen Zellen der Black-Mäuse handeln könnte. Außerdem konnten wir indirekten Hinweisen aus der Literatur (91, 147) entnehmen, daß die genetische Resistenz gegenüber dem Hvh offenbar nicht von Geburt an besteht, sondern daß sie Reifungsprozessen unterliegt, die erst in der vierten Lebenswoche abgeschlossen zu sein scheinen.

Alle diese Umstände leiteten uns zu der Annahme, in der besseren Restriktion der Herpesviren durch die C57-Makrophagen den Schlüssel zum Verständnis der Resistenz dieses Mäusestammes in vivo in der Hand zu haben. Wir vermuteten, daß die Herpesviren an der Barriere der Makrophagen im Peritoneum scheiterten und so an ihrem weiteren Eindringen in den Organismus gehindert würden.

Die Vorbehandlung der C57-Mäuse mit einer Substanz, die die Makrophagen selektiv schädigt, nämlich mit Dextransulfat, blieb jedoch ohne Einfluß auf die Resistenz der Mäuse. Wenn man diesen Versuch vielleicht auch mit Substanzen wiederholen sollte, die ausschließlich auf die Makrophagen wirken, ohne zusätzliche Interaktionen mit den Herpesviren selbst aufzuweisen (41), also etwa mit AMS oder Silikat, zeigt dieser Befund dennoch, daß die Makrophagen für die Resistenz der C57-Mäuse mit hoher Wahrscheinlichkeit von untergeordneter Bedeutung sind.

Neuere Befunde von Kirchner et al. (204) lassen es jedoch möglich erscheinen, daß andere Zellen im Peritoneum eine solche Barriere bilden könnten: Die Autoren konnten zeigen, daß

sich Herpesviren in den Milzzellen zahlreicher Mäusestämme in vitro vermehren, wenn die Tiere zuvor in vivo mit LPS vorbehandelt worden waren, einem Bestandteil des Endotoxins von *Salmonella typhi murium*, das neben seinen makrophagenaktivierenden Eigenschaften auch als B-Zell-Mitogen wirkt. Die Entfernung der Makrophagen aus den Kulturen mit Hilfe bestimmter Techniken beeinflusste die Replikation der Herpesviren nicht, wodurch die alleinige Bedeutung der B-Lymphozyten für die Virusvermehrung in der Milz als erwiesen angesehen wurde. Die Arbeitsgruppe stellte weiter fest, daß einige Mäusestämme keine Reaktion auf die Vorbehandlung mit LPS zeigten, in ihren Milzzellen fand also keine DNA-Synthese statt. Es war daher nicht verwunderlich, daß die Milzzellen der LPS-unsensiblen Stämme die Herpesviren in vitro nicht vermehren konnten. Dagegen überraschte es, daß diese Mäusestämme, unter ihnen auch C57- und C3H/HeJ-Mäuse, auch in vivo gegenüber der i.p. Infektion eine höhere Resistenz zeigten als die LPS-sensiblen Stämme. Besonders bemerkenswert erschien es, daß der Stamm C3H/HeJ sich als 100-fach resistenter erwies als der Stamm C3HeB/FeJ. Hierbei handelte es sich nämlich um zwei genetisch eng verwandte Mäusestämme, von denen man ursprünglich geglaubt hatte, daß sie sich einzig in ihrer LPS-Sensibilität unterscheiden würden. Die B-Lymphozyten im Peritonealexsudat der suszeptiblen FeJ-Mäuse enthielten 24 h nach der Infektion deutlich mehr Virus als die der resistenten HeJ-Mäuse. Die Autoren nahmen daher an, daß ein Defekt in der Replikationsfähigkeit der Herpesviren in den B-Lymphozyten der Peritonealhöhle für die Resistenz der HeJ- und der C57-Mäuse verantwortlich zu machen sei. Die Vermutung liegt nahe, daß eines der

drei die genetische Resistenz gegenüber den Herpesviren bestimmenden Gene eng mit dem der LPS-Sensibilität gekoppelt sein muß.

Daß dieser Faktor aber nicht der allein ausschlaggebende für die in-vivo-Resistenz sein kann, zeigen bereits weitere Befunde von Kirchner et al. selbst (204), nach denen die F_1 -Generation aus C57-Mäusen und einem LPS-sensiblen Mäusestamm trotz erhaltener in-vivo-Resistenz LPS-sensible Milzzellen aufweist, die das Hvh in vitro replizieren.

Wir können also feststellen: Unsere Untersuchungen über das Resistenzverhalten der C57-Mäuse gegenüber den Herpesviren unter Vorbehandlung mit OS haben - erstens - ergeben, daß die Makrophagen in diesem System offenbar von untergeordneter Bedeutung sind. Dagegen erscheint es - zweitens - nach den Befunden von Kirchner et al. (204) nicht ausgeschlossen, daß die B-Lymphozyten in der Bauchhöhle eine Barrierewirkung gegenüber den Herpesviren am Eintrittsort ausüben in solcher Art, wie wir sie ursprünglich für die Makrophagen diskutiert hatten.

Unsere eigenen Befunde, wie auch die in der Literatur, sprechen jedoch dafür, daß weitere, in den Ablauf der Infektion erst später eingreifende Faktoren an der genetischen Resistenz der C57-Mäuse beteiligt sind, daß also - anders ausgedrückt - der eigentliche Block erst in einem späteren Stadium liegen muß. Vergleicht man nämlich den Virusgehalt in den viszeraleen Organen der beiden Mäusestämme, so fällt auf, daß wir in den Ausgangswerten am ersten Tag p.i. nur recht geringe Unterschiede zwischen NMRI- und C57-Mäusen finden, wonach dann bei der Infektion mit dem Stamm Lennette der Titerabfall in den Black-Mäusen in der Regel rascher erfolgt als

in den NMRI-Mäusen. Wäre die Resistenz der C57-Mäuse nämlich allein auf die Barrierewirkung der B-Lymphozyten im Peritoneum zurückzuführen, so hätten wir in Leber und Milz der Tiere bereits deutlich niedrigere Ausgangswerte finden müssen, da weniger Virus die viszerale Organe erreichte.

Wodurch wir uns den schnelleren Abfall des Virusgehaltes in den Organen der C57-Mäuse zu erklären haben, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Es ist aber denkbar, daß hierbei die gesteigerte Interferonproduktion, wie sie Hirt et al. (202) in den Milzzellen immunisierter C57-Mäuse nachgewiesen haben, von Bedeutung ist.

Die deutlichsten Unterschiede im Virusgehalt zwischen den beiden Mäusestämmen finden wir jedoch im ZNS. Im Rückenmark der C57-Mäuse ergeben sich bei Infektion mit dem Stamm Len Werte, die um mindestens eine Zehnerpotenz unter denen der NMRI-Mäuse liegen, für den Stamm D-316 liegen die Werte in den Blackmäusen sogar bis auf eine Ausnahme um mindestens zwei log-Stufen niedriger, in einem Versuch fanden wir bis auf einen positiven Befund in den Blackmäusen am zehnten Tag gar kein Virus, während für die NMRI-Mäuse Werte bis zu 10^4 erreicht wurden. Leider haben wir zu wenige Versuche gemacht, um die Unterschiede auf ihre statistische Wertigkeit hin deutlicher zu qualifizieren. Wir lesen aber aus unseren Ergebnissen die Tendenz ab, daß im ZNS der C57-Mäuse - erstens - von Anfang an weniger Virus vorhanden ist und daß - zweitens - das vorhandene Virus sich nicht wie in den NMRI-Mäusen weiter vermehrt, sondern in der Regel spätestens am siebten bis achten Tag wieder verschwunden ist. (Der bei der Infektion mit dem Stamm D-316 am elften Tag aufgetretene Abfall im Virusge-

halt des ZNS auch der NMRI-Mäuse erscheint als nicht realistisch im Sinne des allgemeinen Krankheitsverlaufs. Er erklärt sich vielmehr dadurch, daß in der Versuchstiergruppe durch die tägliche Tötung zweier Tiere und den natürlichen Tod anderer aufgrund der Infektion für die Titerbestimmungen am Ende des Versuchs solche Tiere übrigbleiben, die die Infektion aufgrund eines leichteren Verlaufs überlebt haben. Diese Tiere stellen dann jedoch keine repräsentativen Vertreter der NMRI-Mäuse dar, da ihre Überlebensrate insgesamt in den Absterbeversuchen sehr niedrig liegt.)

Im Gegensatz zu intraperitonealen erweisen sich die C57-Mäuse bei intracerebraler Inoculation gegenüber den Herpesviren empfänglich. Wir können daraus folgern, daß das ZNS-Gewebe der Blackmäuse prinzipiell suszeptibel für die Infektion mit den Herpesviren ist und daß folglich die Faktoren, die zur Resistenz der Blackmäuse führen, zu einem wesentlichen Teil vor dem Eintritt der Viren in das Zentralnervensystem angreifen müssen.

Während in der i.c.-LD 50 für den Stamm Len keine Unterschiede zwischen den NMRI- und den C57-Mäusen zu beobachten waren, bleibt jedoch bei der i.c. Infektion mit dem Stamm D-316 in wiederholten Versuchen eine zehnfach höhere Resistenz der Black-Mäuse bestehen. Dies läßt sich nur so erklären, daß - zumindest bei der Infektion mit dem Stamm D-316 - zusätzlich zu den vor dem Eintritt in das ZNS angreifenden Abwehrmechanismen auch noch eine höhere Resistenz des zentralnervösen Gewebes selbst die Pathogenese der Infektion in den Blackmäusen beeinflußt. Dabei bleibt ungeklärt, ob die Ursache hierfür in einer Hintanhaltung der primären, direkt durch das

Virus hervorgerufenen oder der sekundären, durch die Reaktion des Wirtes entstehenden Schäden (36) zu suchen ist. Es ist nämlich nicht auszuschließen, daß auch bei den Herpesviren - in Analogie zu den Vorgängen bei der LCM-Infektion (36) - die zelluläre Reaktion der Wirtstiere im ZNS zu dem deletären Effekt der Infektion beiträgt. In diese Richtung weist der Befund von Nahmias et al. (107), nach dem die Vorbehandlung mit Antithymozytenserum, obwohl es bei extracerebraler Infektion zu einer Erhöhung der Mortalität führte, diese bei intracerebraler Virusapplikation senkte. Man kann daraus schließen, daß die entzündliche Reaktion im Gehirn offenbar keine protektiven Folgen für die Herpesinfektion hat, sondern ihren Schaden vergrößert.

Unsere Ergebnisse bezüglich des Virusgehaltes im ZNS der beiden Mäusestämme legen eine Parallele zu zwei anderen Modellen der genetischen Resistenz gegenüber neurotrophen Viren nahe, wie sie Jacoby & Bhatt (13, 68) mit dem Banzivirus, einem Vertreter der Arbo-B-Viren, und die Arbeitsgruppe um Lindenmann (84, 85, 199) an verschiedenen Influenzavirusstämmen entwickelt haben.

So fanden Jacoby & Bhatt (13, 68) bei intraperitonealer Inokulation mit dem Banzivirus eine Differenz der LD 50 um fünf log-Stufen zwischen den resistenten RV- und den suszeptiblen He-Mäusen, die sich auf eine Zehnerpotenz bei intracerebraler Verabreichung des Virus reduzierte. Anhand histologischer Untersuchungen gelang es den Autoren zu zeigen, daß die zelluläre Antwort im Sinne einer Eingrenzung der viralen Läsionen für die Resistenz der RV-Mäuse von entscheidender Bedeutung war. Es traten zwar bei beiden Mäusestämmen, dem

resistenten wie dem suszeptiblen, fokale neuronale Nekrosen im Gehirn auf; während sich diese aber in den empfindlichen Tieren ohne jede zelluläre Reaktion vergrößerten, kam es in den resistenten Mäusen zu der Entstehung perivaskulärer Lymphoidzellinfiltrate, und die neuronalen Nekrosen blieben begrenzt. Ebenso wie dieser feingewebliche Befund deutet auch die Durchbrechbarkeit der Resistenz der RV-Mäuse durch die Gabe von Cyclophosphamid, subletaler Röntgenstrahlung oder Antilymphozytenserum darauf hin, daß bei dieser Arbovirusinfektion die immunologische Kompetenz der Lymphozyten - sowohl außerhalb des ZNS als auch innerhalb - den unterschiedlichen Ablauf der Infektion bestimmt haben.

Auch in unserem Modell der Herpesinfektion liegt angesichts des Titerverlaufs in den Organen die Vermutung nahe, daß die zelluläre Immunität der Blackmäuse an deren Resistenz maßgeblich beteiligt ist. Da die Entstehung der zellulären Immunität einige Tage in Anspruch nimmt, ist es gut vorstellbar, daß die Lymphozyten erst fähig sind, die Herpesviren wirksam zu bekämpfen, wenn diese bereits die viszerale Organe passiert haben (1.-4. d.p.i.), aber noch rechtzeitig, um deren Eintritt in das ZNS (4.-5. d.p.i.) zu verhindern oder zumindest in seiner Quantität herabzusetzen.

Außerdem wäre die Frage zu klären, ob auch bei der Herpesinfektion - etwa in Analogie zu dem von Schell (144, 145) entwickelten Ectromeliemodell - ein schnellerer Anstieg der humoralen AK bei den Blackmäusen die Generalisation der Erreger in der virämischen Phase der Infektion verhindern kann.

Entsprechende Untersuchungen stehen indessen noch aus. Der Einfluß von Immunsuppressiva mit möglichst selektiver Wir-

kung auf die B- und T-Lymphozyten auf die Resistenz der C57-Mäuse sollte getestet werden. Histologische Untersuchungen sollten klären, welches morphologische Korrelat der Resistenz der Blackmäuse zugrundeliegt, d.h. ob wir weniger und kleinere virale Läsionen finden, ob diese - wie im Falle der Banzivirusinfektion - durch eine zelluläre Umgebungsreaktion besser abgegrenzt und am weiteren Fortschreiten gehindert werden oder ob - im Gegensatz hierzu - die Läsionen gerade durch das Fehlen einer Umgebungsreaktion und das Nicht-Ingangkommen immunpathologischer Vorgänge im Sinne des Sekundärschadens kleingehalten werden, wofür die bereits oben (S. 152) erwähnten Befunde von Nahmias et al. (107) über die Gabe von ATS bei i.c. Infektion sprechen würden.

Bei ihren Untersuchungen mit einem intranasal applizierten neurotrophen Myxovirusstamm fanden Lindenmann et al. (85) im Gehirn ganz ähnliche Differenzen im Virusgehalt zwischen den resistenten und suszeptiblen Mäusen wie wir, nämlich bei zunächst nur wenig unterschiedlichen Ausgangswerten einen Abfall des Virusgehaltes bei den resistenten Tieren und einer weiteren Vermehrung bis zum Tod bei den suszeptiblen. Die zunächst angenommene Hypothese, daß auch hier immunologische Vorgänge den unterschiedlichen Ablauf der Infektion bestimmt haben, konnte in späteren Arbeiten (84) nicht belegt werden, da es mit mehreren Immunsuppressiva nicht gelungen ist, die Resistenz der A2G-Mäuse zu durchbrechen. Soweit in der Literatur verfolgbar, ist bis heute noch keine endgültige Klarheit über den verantwortlichen Mechanismus erlangt worden. In jüngster Zeit fanden die Autoren (199) - in bemerkenswerter Analogie zu unseren Ergebnissen mit den Herpesviren -, daß sich

die in-vivo-Resistenz bzw. -Suszeptibilität zahlreicher Mäusestämme gegenüber der intracerebralen Infektion mit einem neurotrophen Myxovirus (NWS) in dem Vermehrungsverhalten eines speziell makrophagenadaptierten Influenzastammes (M-TUR) in den Makrophagenkulturen dieser Mäusestämme in vitro widerspiegelte: Die Makrophagen der in vivo suszeptiblen Tiere vermehrten den Stamm M-TUR, während die der resistenten dies nicht taten. Auch durch mehrfache Rückkreuzungen gelang es nicht, die beiden Eigenschaften voneinander zu trennen. Obwohl dies dafür spricht, daß beide Eigenschaften auf ein und demselben Genlocus vererbt werden, erscheint aber dennoch die Folgerung voreilig, eine kausale Verknüpfung zwischen der Restriktion der Virusvermehrung durch die Makrophagen und der Resistenz des betreffenden Mäusestammes gegen die intracerebrale Infektion als gegeben anzusehen. Denn dies würde bedeuten, daß auch im ZNS die Makrophagen den Verlauf der Infektion bestimmen, wofür aus anderen Untersuchungen (205, 71, 98) keinerlei Hinweise bestehen.

Auch nach Meinung der Autoren selbst (199) ist die Restriktion der Myxoviren in den Makrophagen der resistenten Stämme in vitro eher dahingehend zu interpretieren, daß - wie bereits Gresser & Lang (52) vermuteten - diese spezialisierten Zellen weniger stark als die anderen somatischen Zellen unter Kulturbedingungen Ent-Differenzierungsprozessen unterliegen. Es ist demnach denkbar, daß auch die anderen somatischen Zellen der resistenten Tiere in vivo resistent sind, daß sich aber diese Resistenz der experimentellen Prüfung entzieht, da die Zellen unter den Kulturbedingungen in vitro auf ein Differenzierungsniveau zurücksinken, das unter dem

der Ausbildung der genetischen Resistenz liegt.

In dem dargestellten Myxovirusmodell ist demnach aus dem Verhalten der Makrophagen eines bestimmten Mäusestammes bei der Infektion mit dem makrophagenadaptierten Stamm *in vitro* eine Voraussage über die Resistenz dieses Mäusestammes gegenüber der *i.c.* Infektion mit dem neurotrophen Virusstamm *in vivo* möglich und umgekehrt; zwischen beiden Eigenschaften besteht jedoch keine Ursache-Wirkungsbeziehung, vielmehr müssen beide Eigenschaften als "zwei Facetten desselben Phänomens" (199) angesehen werden, deren gemeinsamer ursächlicher Faktor weiterhin im Dunkeln bleibt. Die Tatsache aber, daß beide Charakteristika augenscheinlich durch dasselbe Gen vererbt werden, legt die Vermutung nahe, daß der Mechanismus in beiden Fällen, bei der Restriktion der Viren durch die Makrophagen *in vitro* und bei der Resistenz des ZNS-Gewebes *in vivo* derselbe ist, denn es ist unwahrscheinlich, daß ein und dasselbe Gen eine genetische Resistenz auf zwei verschiedene Weisen weitergibt.

Ob der Restriktion der Herpesviren durch die C57-black-Makrophagen eine ähnliche "Markerbedeutung" zukommt wie im Falle der Myxoviren, können wir aus unseren Ergebnissen nicht ableiten. Es wäre notwendig, die Makrophagen zahlreicher anderer Mäusestämme von unterschiedlicher Resistenz *in vivo* auf ihr Vermehrungsverhalten gegenüber den Herpesviren zu testen. Wir müssen im Übrigen davon ausgehen, daß die Verhältnisse bei der genetischen Resistenz gegenüber den Herpesviren mit hoher Wahrscheinlichkeit noch um ein Vielfaches komplizierter sind als bei den Myxoviren, da diese nicht wie dort auf einem, sondern auf drei Genen vererbt wird. In diesem Sinne haben

auch die Ergebnisse von Kirchner et al. (204) gezeigt, daß sich die Charakteristika der in-vivo-Resistenz und der LPS-Unempfindlichkeit und damit der Restriktion der Herpesviren in den B-Lymphozyten in vitro durch Rückkreuzung voneinander trennen lassen, so daß die Annahme naheliegt, daß auch die Restriktion der Herpesviren durch die Makrophagen auf einem anderen Genlocus vererbt wird als die in-vivo-Resistenz der Maus insgesamt.

Bei der Sektion von i.p. mit dem Stamm D-316 (Hvh-2) infizierten C57-Mäusen haben wir niemals Lebernekrosen beobachtet. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit dem von Mogensen (99), der in den C57-Mäusen ebenfalls ein vollständiges Fehlen von Lebernekrosen nach i.p. Infektion mit zahlreichen Hvh-2-Stämmen fand, während diese in den meisten anderen Mäusestämmen (AH, Balb c, CBA, C3H, DBA und NMRI, hier allerdings nur bis zur vierten Lebenswoche) mit großer Regelmäßigkeit auftraten. Welche Bedeutung das Fehlen der Lebernekrosen in den Blackmäusen für die Pathogenese der Infektion hat, läßt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. Auffällig erscheint der Befund, daß zu den Mäusestämmen, die keine Nekrosen entwickelten, außer den C57-bl-6- und -10- sowie den GR-Mäusen auch noch ein nude-Stamm der Balb-c-Mäuse gehörte, während die normalen Balb-c-Mäuse Lebernekrosen aufwiesen. Es konnte jedoch trotzdem nicht sicher nachgewiesen werden, daß es sich bei der Bildung dieser Läsionen um ein T-Zell-gesteuertes Phänomen handelt, da sich der nude-Stamm nicht nur durch einen T-Zell-Defekt, sondern auch noch in einem Teil seiner übrigen genetischen Konstitution von dem normalen Balb-Stamm

unterschied und daher auch andere Mutationen für diese Differenz verantwortlich sein können. Leider fehlen in der zitierten Arbeit begleitende Absterbeuntersuchungen, aus denen hätte ersichtlich werden können, inwieweit auch die anderen, nicht-Lebernekrosen-bildenden Stämme außer den C57-Mäusen in vivo ebenfalls resistenter gegen die Hvh-2-Infektion sind als die Nekrosen-bildenden. Die Tatsache, daß auch Hvh-1-Stämme von gleicher intraperitonealer Pathogenität in vivo keine Lebernekrosen hervorrufen, verdeutlicht jedoch bereits, daß diese Eigenschaft wohl kein grundlegendes Kriterium für die Beherrschbarkeit der Infektion im Organismus darstellen kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die genetische Resistenz der C57-Mäuse gegenüber der intraperitonealen Herpesinfektion ein sehr komplexes System darstellt, an dem wahrscheinlich mehrere Faktoren beteiligt sind:

Während sich die Makrophagen nach unseren Untersuchungen als nicht maßgeblich beteiligt erwiesen haben, ist nach den Befunden von Kirchner et al. (204) ein Wirksamwerden der B-Lymphozyten im Peritoneum als Barriere gegenüber der Virusvermehrung am Eintrittsort nicht auszuschließen.

Der wesentlichere Teil der Faktoren greift jedoch wahrscheinlich nach der Generalisation der Infektion, d.h. hinter den primär-affinen Organen, aber vor dem Eindringen der Erreger ins ZNS in die Pathogenese der Infektion ein. Über die Art dieser Mechanismen herrscht im Einzelnen noch keine Klarheit, es sprechen jedoch einige Hinweise dafür, daß die C57-Mäuse über eine generell verbesserte Abwehrleistung ihrer zellulären Immunität, also ihrer T- und B-Lymphozyten, vielleicht aber auch über eine gesteigerte Aktivität in der Pro-

duktion humoraler antiviraler Antikörper verfügen. Vielleicht kommt auch dem Interferon eine gewisse Bedeutung bei der genetischen Resistenz der Blackmäuse zu.

Das Erhaltenbleiben einer mehr als 10-fach höheren Resistenz der C57-bl-Mäuse gegenüber den NMRI-Mäusen bei intracerebraler Infektion mit dem Stamm D-316 gibt zu der Vermutung Anlaß, daß - zumindest bei diesem Hvh-2-Stamm - zusätzlich zu den genannten, vor dem Eintritt der Viren ins ZNS angreifenden Faktoren, auch das zentralnervöse Gewebe der Blackmäuse selbst - auf welche Weise auch immer - die Infektion oder deren pathologisches Korrelat besser begrenzen kann.

Die beschriebene genetische Resistenz der C57-bl-Mäuse ist offenbar ganz eng auf die Gruppe des Herpesvirus hominis beschränkt, da dieser Mäusestamm nach Untersuchungen von Selgrade & Osborn (147) sogar noch empfindlicher gegenüber der MCV-Infektion sind als der Stamm CBA. Die genetische Resistenz gegenüber dem MCV scheint auch insofern auf ganz anderen Prinzipien zu beruhen als die gegenüber dem Hvh, als bei ihr sicherlich die Resistenz der somatischen Einzelzelle den ausschlaggebenden Faktor darstellt.

Es sei in diesem Zusammenhang noch erwähnt, daß Carrit & Goldfarb (18) in Zellhybriden aus humanen somatischen Zellen mit chinesischen Hamsterzellen auf dem Chromosom 3 des Menschen eine Determinante für die Resistenz gegenüber den Herpesviren demonstrieren konnten. Demnach sind offenbar also auch genetische Faktoren an der Pathogenese der Herpesinfektion beim Menschen mitbeteiligt.

4.4. Die Rolle weiterer Abwehrmechanismen bei der Pathogenese der Herpesinfektion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über den Einfluß der Vorbehandlung mit TM geben einen weiteren Anhaltspunkt dafür, daß die Makrophagen in der Frühphase der experimentellen Herpesinfektion der jungen Erwachsenenmüas eine wesentliche Rolle spielen. Wir müssen jedoch davon ausgehen, daß die Makrophagen nur einen Bestandteil des Abwehrsystems darstellen, an dem auch andere Faktoren maßgeblich beteiligt sind. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, kommt dabei dem Interferon und besonders den Lymphozyten in einer Vielfalt von verschiedenen Interaktionen große Bedeutung zu.

So behandelten Gresser et al. (53) ihre Mäuse vor der intraperitonealen oder subcutanen Infektion mit einem Hvh-1-Stamm mit einem Anti-Interferon-Globulin und beobachteten hierbei eine deutliche Verstärkung der Pathogenität der Viren. Es blieb jedoch ungeklärt, von welchen Zellen das Interferon in diesem Falle gebildet wurde.

Nach Untersuchungen von Valle et al. (166) und Babiuk & Rouse (9) sind die T-Lymphozyten sowohl für die Produktion als auch für die immunspezifische Freisetzung des Interferons verantwortlich. Allerdings ist die Anwesenheit von Makrophagen eine Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zellen. Man nimmt an, daß den Makrophagen neben ihrer Phagozytose- und Killertätigkeit auch die Funktion zukommt, die Antigene den Lymphozyten in einer Form anzubieten, die diesen ein optimales Reagieren ermöglicht ("Antigen-Prozessing") (9, 47).

Neben diesen Arbeiten, die die Funktion der Lymphozyten als Freisetzer von Mediatoren wie dem Interferon zur Zerstörung der Erreger demonstrieren, zeigen andere Befunde, daß auch die Lymphozyten selbst mit den Viren in Beziehung treten und sie vernichten können:

So berichtet Oakes (116) von dem Modell einer subcutanen Herpesinfektion, in dem die Makrophagen als Effektorzellen nicht mehr gebraucht werden, sondern in dem der Transfer von sensibilisierten Milzzellen allein einen protektiven Effekt im röntgenbestrahlten Wirt ausübt. Analog beschreibt Ennis (33) den protektiven Effekt sensibilisierter Milzzellen - sogenannter "lymphoider Zellen" - auf eine Herpesinfektion in vitro.

Für eine wesentliche Rolle der Lymphozyten in der Pathogenese der subcutanen Herpesinfektion spricht weiterhin die Tatsache (206), daß adulte Mäuse gegen eine subcutane Inoculation in die nicht vorbehandelte Hinterpfote weitgehend resistent sind, daß diese Resistenz jedoch fehlt, wenn die Mäuse mit Cyclophosphamid, Antilymphozyten- oder Antithymozytenserum vorbehandelt werden. Die Ausschaltung der Lymphozyten erhöht das neuroinvasive Potential (206) der Herpesviren, da diejenigen Abwehrmechanismen außer Kraft gesetzt werden, die normalerweise die Infektion an ihrem extraneuronalen Inokulationsort eingrenzen. Da die obengenannten Substanzen sich selektiv gegen die Lymphozyten richten, die Makrophagenfunktion jedoch intakt lassen, muß gefolgert werden, daß die letzteren für die subcutane Inokulationsroute wohl nicht von großer Bedeutung sind (64, 116). Wie aus der hohen Letalität subcutaner Herpesinfektionen bei jungen adulten Mäusen, die postnatal thymektomiert wurden (200), hervorgeht, sind es innerhalb der

Lymphozyten vor allem die thymusabhängigen, die diese Abwehrfunktion gegen die Viren erbringen (103).

Andererseits zeigen die Befunde von Kirchner et al. (204) über die in-vivo-Resistenz nicht LPS-sensibler Mäusestämme gegenüber der intraperitonealen Herpesinfektion, daß neben den T-Zell-gesteuerten Phänomenen auch die B-Lymphozyten in der Frühphase der Infektion von Bedeutung sind.

Bei der i.p. Inokulation führt die Gabe von Cyclophosphamid zu einer Erhöhung der Pathogenität der Herpesinfektion in adulten Mäusen, wobei der Virusgehalt in Leber und Milz über die Werte in den Viruskontrollen ansteigt (125, 185). Dieser Effekt ist wiederum antagonisierbar durch die Gabe immuner T-Zellen aus der Milz oder normaler Milzzellen und humoraler Antikörper (125). Ob die bei Vorbehandlung mit Cortison (27) auftretende Erhöhung der Pathogenität der i.p. Herpesinfektion auf einer Schädigung der Lymphozyten oder der Makrophagen beruht, konnte bisher nicht entschieden werden.

Es ist anzunehmen, daß die Lymphozyten auf mindestens zwei verschiedene Weisen mit den Viren in Interaktion treten, nämlich einmal, wie Kirchner et al. (204) nachweisen konnten, direkt beim Eintritt der Erreger in den Organismus (B-Lymphozyten), zum anderen aber auch, wie bereits Zisman et al. es forderten (179), in einem späteren Stadium der Infektion, zu dem sich die Viren bereits ausgebreitet und vermehrt haben (T-Zellen?). Unsere eigenen Befunde hinsichtlich der genetischen Resistenz der C57-Mäuse, die ergaben, daß der entscheidende Stop, der zu der Resistenz der Blackmäuse führt, offenbar nach der Passage der viszerale Organe, aber vor dem Eintritt der Viren ins ZNS liegt, machen die Vermutung wahrschein-

lich, daß auch diesem Phänomen eine lymphozytäre Reaktion vom zweiten Typ zugrundeliegt.

Auch eine Reihe anderer Arbeiten demonstrieren die Notwendigkeit der Lymphozyten, und zwar sowohl bei der experimentellen Herpesinfektion (54, 67, 138) als auch in der Pathogenese des rekurrierenden Herpes labialis des Menschen (140, 149, 153, 177).

Die Rolle der humoralen Antikörper scheint dabei unter anderem in einer besseren Kenntlichmachung infizierter Zielzellen und damit ebenfalls in einer besseren Präsentation des Antigens für die Effektorzellen (54, 138) zu bestehen.

5. Zusammenfassung

Die Vermehrbarkeit verschiedener Stämme des Herpesvirus hominis Typ 1 und Typ 2 in 24 h alten Kulturen von normalen und TM-stimulierten Peritonealmakrophagen in vitro wurde getestet. Dabei wurde deutlich, daß TM-stimulierte Makrophagen die Viren generell besser vermehren können als normale. Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine Virusvermehrung bis auf eine Ausnahme (Isolat "Eckert", Hvh-1) nur in NMRI-Makrophagen möglich ist. In den Makrophagen der C57-bl-Mäuse ist die Multiplikation der Herpesviren dagegen reprimiert.

Unter den untersuchten Hvh-Stämmen besteht hinsichtlich ihrer Vermehrbarkeit eine Rangordnung: Während sich der Stamm Lennette (Hvh-1) (Gruppe 1) in normalen und stimulierten NMRI-Makrophagen vermehren kann, fand sich für die Typ-1-Stämme IES und L3-2S und den Intermediärstamm ER (Gruppe 2) eine Virusmultiplikation ausschließlich in stimulierten NMRI-Makrophagen. Die beiden Typ-2-Stämme D-316 und DD (Gruppe 3) zeigen zwar auch in den stimulierten NMRI-Makrophagen eine Vermehrungstendenz, diese ist jedoch wesentlich geringer als bei den getesteten Typ-1-Stämmen. Als Ursache hierfür wurde die erhöhte Labilität der Hvh-2-Stämme gegenüber Temperatur- und pH-Einflüssen diskutiert. Eine Ausnahmestellung nimmt (s.o.) das frische Isolat "Eckert" (Hvh-1) (Gruppe 4) ein, das sich in normalen und stimulierten Makrophagen sowohl der NMRI- als auch der C57-Mäuse gleich gut vermehrt. Es ist möglich, daß die erhöhte Vermehrungspotenz dieses Stammes mit der Tatsache in Zusammenhang zu bringen ist, daß es sich hierbei um einen frisch isolierten Stamm in der ersten und zweiten Zellpassage

handelt. Insgesamt liegt die in den NMRI-Makrophagen beobachtete Multiplikationsrate der Herpesviren (circa 1 log-Stufe) wesentlich unter der in den anderen somatischen Zellen.

Zwischen den Fibroblastenkulturen der beiden Mäusestämme ergaben sich nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Vermehrbarkeit der Herpesviren.

In vivo wurde die Pathogenese der intraperitonealen Herpesinfektion unter der Applikation von Thioglycollat-Medium (TM) anhand der beiden Stämme Lennette (Hvh-1) und D-316 (Hvh-2) untersucht. Bei Gabe von TM 72 h a.i. (Langzeiteffekt) traten für Lennette eine Abnahme, für D-316 dagegen eine Erhöhung der Pathogenität auf. Es wurde daher das Bestehen mindestens zweier unterschiedlicher Klassen des Hvh postuliert, die sich hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber den Makrophagen grundsätzlich voneinander unterscheiden: Während die einen von den Zellen aufgenommen und unschädlich gemacht werden können (Prototyp Lennette), entgehen die anderen (Prototyp D-316) der intrazellulären Zerstörung und benutzen die somit funktionell toten Makrophagen vielleicht sogar als Vehikel auf ihrem Weg zu den viszeralen Organen und zu den peripheren Nervenendigungen.

Die Gabe von TM 3 h a.i. (Kurzzeiteffekt) führt demgegenüber bei dem Stamm Lennette zu einer Steigerung, bei dem Stamm D-316 zu einer Erniedrigung der Mortalität. Für diese Kurzzeiteffekte haben wir direkte Interaktionen der Substanz mit den Makrophagen auf der einen (toxische Schädigung der Zellen durch TM bei Infektion mit Lennette) und mit den Viren

auf der anderen Seite (Hemmung der Adsorption bei Infektion mit D-316) verantwortlich gemacht. Unter der Annahme der Hypothese, daß die D-316-Viren die funktionell toten Phagozyten als Vehikel benutzen, ist es außerdem verständlich, daß eine Außer-Kraft-Setzung der residenten Makrophagenpopulation durch die Gabe von TM 3 h a.i. einen protektiven Effekt auf die Infektion mit dem Stamm D-316 hat, weil dadurch eben diese Vehikel ausgeschaltet werden.

In weiteren Versuchen haben wir uns mit der unterschiedlichen Resistenz der NMRI- und der C57-Mäuse gegenüber der intraperitonealen Herpesinfektion beschäftigt. Unsere Untersuchungen ergaben, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit weder die geringere Vermehrbarkeit der Herpesviren in den Makrophagen der Black-Mäuse noch eine generelle Unempfindlichkeit aller somatischen Zellen gegenüber den Erregern die Ursache für die Resistenz darstellen.

Es handelt sich hierbei vielmehr um ein komplexes Phänomen, an dem wahrscheinlich zahlreiche Faktoren beteiligt sind. Zu ihnen gehören mit einiger Sicherheit die lokale Reaktion der B-Lymphozyten im Peritoneum in der Frühphase der Infektion sowie eine verstärkte Interferonproduktion in den viszerale Organen der Blackmäuse.

Der Vergleich des Titerverlaufs in den Organen der beiden Mäusestämme legt jedoch die Vermutung nahe, daß der entscheidende Stop bei den Black-Mäusen nach der Passage von Leber und Milz, aber vor dem Eindringen der Viren in das ZNS zu suchen ist. Einige Hinweise sprechen dafür, daß die Lymphozyten für diesen Mechanismus verantwortlich sind.

6. Tabellarischer Anhang

Tabelle 6.1 bis Tabelle 6.7: Virusgehalt im Überstand von mit verschiedenen Stämmen des Hvh-1 und -2 infizierten Makrophagenkulturen. Alle Angaben einschließlich $\bar{x}$ und s in log pfu.

Tabelle 6.1 Lennette (Hvh-1)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.04	2.95	2.30	3.11	3.11	3.36	2.48	2.30
2	3.03	3.08	3.08	2.85	3.20	3.18	3.20	3.15
3	2.30	1.70	2.48	2.00	3.11	3.08	2.60	2.00
4	3.00	2.78	3.04	3.15	3.49	3.43	3.40	2.60
5	2.90	2.78	2.70	2.90	3.78	3.48	3.30	3.48
6	2.90	2.85	2.90	2.90	3.60	3.60	3.11	2.90
$\bar{x}$	2.86	2.69	2.75	2.82	3.38	3.36	3.02	2.74
s	0.28	0.50	0.31	0.42	0.28	0.19	0.38	0.55

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.70	2.90	3.43	3.45	3.43	3.40	3.30	3.23
2	3.40	3.15	3.11	3.00	4.40	4.48	4.42	4.40
3	1.70	1.30	1.48	2.60	3.70	3.85	3.70	3.00
4	2.30	2.60	3.04	3.90	4.20	4.04	3.48	2.60
$\bar{x}$	2.53	2.49	2.77	3.24	3.93	3.94	3.73	3.31
s	0.71	0.82	0.87	0.56	0.45	0.45	0.49	0.77

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.00	3.38	2.85	3.23	2.78	2.60	2.00	1.85
2	1.85	1.85	1.85	1.85	2.00	1.78	1.60	1.60
3	1.48	1.30	1.30	2.00	2.00	1.48	-	1.00
4	2.00	2.60	2.60	2.48	2.30	2.48	2.00	1.70
5	2.60	2.70	2.85	2.88	2.95	2.78	2.00	2.15
6	2.60	2.00	2.00	2.30	2.36	2.48	2.30	-
7	3.00	3.00	2.78	3.04	2.30	2.60	2.48	2.00
8	2.46	2.32	2.11	2.15	1.78	2.46	2.08	1.48
9	1.30	1.48	1.00	1.48	-	-	-	-
10	3.11	2.90	2.70	2.85	2.48	2.60	2.00	2.00
$\bar{x}$	2.34	2.35	2.20	2.43	2.10	2.13	1.65	1.38
s	0.65	0.68	0.67	0.57	0.82	0.85	0.90	0.80

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.04	3.04	3.26	2.90	3.08	2.74	2.48	1.70
2	1.48	1.60	1.30	1.60	1.48	1.30	1.00	-
3	2.48	2.48	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30
$\bar{x}$	2.33	2.37	2.29	2.27	2.29	2.11	1.93	1.33
s	0.79	0.73	0.98	0.65	0.80	0.74	0.81	1.19

e) normale Balb-c-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.48	2.90	3.23	3.43	3.34	2.95	3.23	2.48
2	2.30	2.30	2.30	2.95	3.15	2.85	2.85	2.48
3	2.30	2.48	2.60	3.04	3.48	3.00	2.95	2.30
4	2.08	2.00	2.00	2.70	2.70	2.85	3.00	2.00
5	2.78	2.78	2.60	2.78	2.60	2.00	2.48	2.00
6	1.30	1.85	2.11	2.04	2.04	2.11	1.85	1.60
7	1.30	1.70	1.78	2.20	1.85	1.95	1.70	1.48
8	3.11	2.85	2.90	3.04	3.40	3.48	3.30	2.70
$\bar{x}$	2.33	2.36	2.44	2.77	2.82	2.65	2.67	2.13
s	0.79	0.47	0.48	0.46	0.63	0.56	0.61	0.44

f) normale CBA-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	1.95	1.70	1.85	1.85	2.11	2.30	2.30	-
2	2.48	2.70	2.30	2.48	2.40	2.30	2.60	-
3	1.60	1.60	1.78	2.15	2.40	2.08	1.85	-
4	2.60	3.00	3.00	3.40	3.85	3.70	2.48	2.11
$\bar{x}$	2.16	2.25	2.26	2.47	2.69	2.60	2.31	0.53
s	0.47	0.70	0.61	0.67	0.79	0.74	0.33	1.06

Tabelle 6.2 L3-2S (Hvh-1)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	2.48	2.30	2.18	1.60	1.70	1.30	1.00
2	3.70	3.48	3.60	3.70	3.30	3.78	3.60	2.95
3	3.60	3.90	3.70	3.90	4.00	3.95	3.60	3.30
$\bar{x}$	3.20	3.29	3.20	3.47	2.97	3.14	2.83	2.42
s	0.78	0.73	0.78	0.59	1.23	1.25	1.33	1.24

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.15	2.60	2.00	2.78	3.00	2.43	2.48	2.30
2	3.90	4.00	4.30	4.32	4.95	4.95	4.95	4.90
3	3.70	3.60	3.70	3.95	4.08	3.95	3.60	3.00
4	2.60	2.30	2.00	2.30	2.48	2.48	2.70	2.00
5	2.30	2.30	2.30	3.00	3.90	4.20	3.60	3.00
$\bar{x}$	2.93	2.96	2.86	3.37	3.68	3.46	3.47	3.04
s	0.81	0.79	1.07	0.84	0.96	0.99	0.97	1.13

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.95	2.48	2.48	2.30	2.60	2.30	1.60	1.30
2	3.30	3.30	3.00	3.60	3.60	3.78	3.00	3.00
$\bar{x}$	3.13	2.89	2.74	2.95	3.10	3.04	2.30	2.15
s	0.25	0.58	0.37	0.92	0.71	1.05	0.99	1.20

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.90	2.48	2.48	2.70	2.11	1.48	-
2	3.30	3.30	3.70	4.28	4.23	4.40	3.95	3.00
3	2.08	2.08	1.85	2.04	1.60	1.60	-	-
$\bar{x}$	2.62	2.76	2.68	2.93	2.84	2.70	1.81	1.00
s	0.62	0.62	0.94	1.19	1.32	1.49	2.00	1.73

Tabelle 6.3 IES (Hvh-1)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.60	2.54	2.42	2.30	1.90	2.30	2.00	-
2	3.30	3.18	2.95	3.34	2.78	3.04	2.48	2.48
3	2.30	2.00	2.08	1.95	1.48	1.30	-	-
4	2.48	2.64	2.53	2.32	2.30	2.04	2.00	1.85
5	2.85	2.85	2.70	2.78	2.78	2.42	1.60	1.70
6	2.48	2.70	2.60	2.11	1.30	1.00	-	1.00
$\bar{x}$	2.67	2.65	2.55	2.47	2.09	2.02	1.35	1.17
s	0.36	0.39	0.29	0.51	0.64	0.75	1.08	1.02

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.04	3.15	3.36	3.30	3.18	2.48	2.85	2.30
2	3.95	4.04	3.60	3.78	4.04	3.90	4.42	3.95
3	2.60	2.48	2.78	2.70	2.60	2.90	2.60	1.85
4	2.70	2.30	2.00	2.70	3.48	2.78	2.70	2.30
5	1.95	2.30	2.78	2.78	3.40	3.60	3.30	3.11
$\bar{x}$	2.85	2.85	2.90	3.05	3.34	3.13	3.17	2.70
s	0.73	0.75	0.62	0.48	0.52	0.59	0.75	0.83

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.18	2.46	2.38	2.08	2.28	1.78	1.30
2	2.85	2.60	2.11	2.24	2.60	2.85	2.00	1.70
3	2.26	2.38	2.20	2.43	1.95	1.90	1.60	1.00
4	2.38	2.32	2.11	2.15	1.78	1.85	1.95	1.30
5	1.30	1.48	1.00	1.48	-	-	-	-
6	2.90	2.00	2.26	2.60	2.48	2.36	2.00	1.68
$\bar{x}$	2.36	2.16	2.02	2.21	1.82	1.87	1.56	1.16
s	0.58	0.39	0.52	0.39	0.94	0.99	0.78	0.63

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.85	2.70	2.60	2.60	2.32	2.23	1.70	1.00
2	2.30	2.00	2.30	2.60	2.48	2.48	2.00	2.00
3	2.15	2.04	1.90	2.11	2.30	2.08	2.00	1.78
$\bar{x}$	2.43	2.25	2.27	2.44	2.37	2.26	1.90	1.59
s	0.37	0.39	0.35	0.28	0.10	0.20	0.17	0.53

e) normale Balb-c-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.00	2.48	2.60	2.60	2.30	2.23	2.04
2	2.40	2.58	2.42	2.52	2.36	2.42	1.60	1.00
3	2.38	2.42	2.34	2.51	2.20	1.60	1.00	1.00
$\bar{x}$	2.42	2.33	2.41	2.54	2.39	2.11	1.61	1.35
s	0.05	0.30	0.07	0.05	0.20	0.44	0.62	0.60

f) normale CBA-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.70	2.48	2.00	2.30	2.78	1.78	1.85
2	1.00	1.30	1.48	1.00	1.30	-	-	-
3	2.34	2.51	2.60	2.36	2.72	2.36	2.32	-
$\bar{x}$	1.94	2.17	2.19	1.79	2.11	1.71	1.37	0.62
s	0.82	0.76	0.61	0.71	0.73	1.50	1.21	1.07

Tabelle 6.4 Eckert (Hvh-1)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1 ⁺	2.00	2.11	2.18	2.30	2.00	1.79	1.60	1.30
2	2.60	2.78	2.78	3.48	3.85	3.30	3.48	3.00
$\bar{x}$	2.30	2.45	2.48	2.89	2.93	2.55	2.54	2.15
s	0.42	0.47	0.42	0.83	1.31	1.07	1.33	1.20

⁺ = schlechte Kultur, viele Erythrozyten

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.23	3.30	3.00	3.08	3.29	3.34	3.52	3.70
2	2.00	2.00	2.00	2.85	3.52	3.34	3.20	2.70
3	2.70	2.60	2.95	3.30	3.90	4.15	4.15	3.70
$\bar{x}$	2.64	2.63	2.65	3.08	3.57	3.61	3.62	3.37
s	0.62	0.65	0.56	0.23	0.31	0.47	0.48	0.58

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.95	2.90	2.85	3.30	3.85	3.60	3.30	3.00
2	2.36	2.32	2.26	2.28	2.48	2.00	2.00	2.36
3	2.11	2.48	2.30	2.60	2.70	2.90	2.48	2.30
$\bar{x}$	2.47	2.57	2.47	2.73	3.01	2.83	2.59	2.55
s	0.43	0.30	0.33	0.52	0.74	0.80	0.66	0.39

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.20	2.00	2.60	2.30	3.20	3.00	2.60	2.48
2	2.04	2.30	2.60	2.30	3.08	3.08	2.95	2.78
$\bar{x}$	2.12	2.15	2.60	2.30	3.14	3.04	2.78	2.63
s	0.11	0.21	0.00	0.00	0.08	0.06	0.25	0.21

e) normale CBA-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	1.95	2.30	2.48	2.30	2.48	2.60	2.75	2.60

Tabelle 6.5 ER (intermediär)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	2.34	2.23	1.90	2.00	2.00	1.48	1.00
2	3.23	3.11	3.18	3.15	2.85	2.85	2.95	2.00
3	2.29	2.11	2.08	1.60	1.60	1.60	-	-
4	1.90	2.00	1.93	1.85	1.85	1.85	1.48	1.00
5	2.11	2.32	2.60	3.08	2.42	2.48	2.73	-
$\bar{x}$	2.37	2.38	2.40	2.32	2.14	2.16	1.73	0.80
s	0.51	0.43	0.50	0.74	0.49	0.50	1.18	0.84

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	2.00	2.48	2.26	2.00	1.90	1.95	1.48
2	3.48	3.30	3.18	3.00	4.04	4.08	3.85	3.08
3	2.00	2.00	2.30	2.85	3.08	3.00	2.48	2.23
4	2.04	1.48	2.26	2.48	3.00	3.08	2.30	2.00
$\bar{x}$	2.46	2.20	2.56	2.65	3.03	3.02	2.65	2.20
s	0.70	0.78	0.43	0.34	0.83	0.89	0.83	0.67

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.52	2.59	2.58	2.36	2.00	1.30	1.48	1.78
2	2.00	2.00	2.60	2.48	2.30	2.00	2.00	-
$\bar{x}$	2.26	2.30	2.59	2.42	2.15	1.65	1.74	0.89
s	0.37	0.42	0.01	0.08	0.21	0.50	0.37	1.26

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.43	2.34	2.32	2.30	2.00	1.78	1.48	1.48
2	1.85	2.30	2.30	2.00	2.30	2.43	2.00	2.00
3	2.30	2.30	2.00	2.26	3.08	3.00	2.90	2.85
$\bar{x}$	2.19	2.31	2.21	2.19	2.46	2.40	2.13	2.11
s	0.30	0.02	0.18	0.16	0.56	0.61	0.72	0.69

Tabelle 6.6 D-316 (Hvh-2)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	1.60	1.90	1.30	1.78	1.48	1.30	-
2	3.00	2.48	2.30	2.11	2.00	1.90	1.60	1.30
3	1.95	1.60	2.00	1.70	1.48	1.60	-	-
$\bar{x}$	2.42	1.89	2.07	1.70	1.75	1.66	0.97	0.43
s	0.53	0.51	0.21	0.41	0.26	0.22	0.85	0.75

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	1.60	1.95	2.08	1.48	2.00	1.60	1.30	1.00
2	3.08	2.95	2.95	2.30	3.26	3.28	2.60	2.48
3	1.30	1.30	1.30	1.48	1.48	1.30	1.30	-
4	1.48	1.70	1.85	1.30	1.40	1.48	1.30	1.00
5	1.30	-	1.00	-	1.48	1.48	1.48	-
6	1.60	-	1.78	1.70	2.08	2.42	1.70	1.00
7	2.08	2.30	2.34	1.78	2.34	1.85	2.04	1.90
$\bar{x}$	1.78	1.46	1.90	1.43	2.01	1.92	1.67	1.05
s	0.63	1.12	0.65	0.71	0.66	0.77	0.49	0.91

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.11	1.95	1.85	1.95	1.60	-	1.00	-
2	1.00	1.30	1.30	1.00	1.48	1.60	1.30	-
3	1.85	1.95	1.88	1.85	1.48	1.60	1.30	-
$\bar{x}$	1.65	1.73	1.68	1.60	1.52	1.07	1.20	-
s	0.58	0.38	0.33	0.52	0.07	0.92	0.17	-

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.11	2.04	1.90	2.08	1.48	-	-	-
2	1.00	1.30	1.30	1.78	1.60	1.00	-	1.00
3	1.48	1.48	1.48	1.70	1.78	1.60	1.60	1.00
4	2.00	1.90	1.60	1.78	1.70	1.70	1.00	-
$\bar{x}$	1.65	1.68	1.57	1.84	1.64	1.08	0.65	0.50
s	0.51	0.35	0.25	0.17	0.13	0.78	0.79	0.58

Tabelle 6.7 DD (Hvh-2)

a) normale NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	1.90	2.15	1.95	1.48	1.00	1.00	-	-
2	2.85	2.52	2.48	2.08	2.23	1.95	1.30	1.48
3	2.11	2.18	2.26	1.90	2.23	1.95	1.95	1.70
$\bar{x}$	2.29	2.28	2.23	1.82	1.82	1.63	1.08	1.06
s	0.50	0.21	0.27	0.31	0.71	0.55	0.89	0.92

b) stimulierte NMRI-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.15	1.95	1.85	1.30	1.85	1.30	1.60	-
2	2.48	2.30	2.30	2.30	2.90	2.90	3.28	2.70
3	2.85	2.48	2.78	2.48	2.00	2.78	2.70	2.70
$\bar{x}$	2.49	2.24	2.31	2.03	2.25	2.33	2.53	1.80
s	0.35	0.27	0.47	0.64	0.57	0.89	0.85	1.56

c) normale C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	1.95	2.00	1.85	1.30	1.00	1.00	-	-
2	2.18	1.90	2.36	2.20	2.32	2.32	2.18	2.30
$\bar{x}$	2.07	1.95	2.11	1.75	1.66	1.66	1.09	1.15
s	0.16	0.07	0.36	0.64	0.93	0.93	1.54	1.63

d) stimulierte C57-Makrophagen

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.15	1.95	1.95	1.60	1.70	1.48	1.00	-
2	2.00	2.00	2.60	2.95	3.18	2.60	2.00	2.45
3	2.95	2.95	3.00	3.20	2.60	2.60	2.60	2.60
$\bar{x}$	2.37	2.30	2.52	2.58	2.49	2.23	1.87	1.68
s	0.51	0.56	0.53	0.86	0.75	0.65	0.81	1.46

Tabelle 6.8 bis Tabelle 6.13: Virusgehalt im Überstand von mit verschiedenen Stämmen des Hvh-1 und -2 infizierten Fibroblastenkulturen. Alle Angaben einschließlich $\bar{x}$ und s in log pfu.

Tabelle 6.8 Lennette (Hvh-1)

a) NMRI-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.85	3.70	4.00	4.00	5.30	5.23	5.04	n.d.
2	4.00	3.95	4.11	3.95	5.08	5.90	3.48	3.48
3	4.48	4.48	4.78	n.d.	5.90	5.15	4.78	n.d.
4	2.00	2.30	2.78	n.d.	5.23	5.08	4.70	4.00
5	2.30	2.30	2.90	4.30	4.85	5.60	4.48	3.95
$\bar{x}$	3.33	3.45	3.71	4.08	5.27	5.39	4.50	3.81
s	1.10	1.00	0.85	0.19	0.39	0.35	0.60	0.29

b) C57-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	n.d.	3.00	n.d.	5.48	5.00	4.48	n.d.
2	n.d.	2.30	3.11	n.d.	5.08	5.20	5.26	4.48
3	3.00	3.30	3.85	n.d.	5.30	5.30	4.00	3.30
4	3.30	3.48	3.90	n.d.	4.60	4.85	4.95	4.00
5	1.95	1.70	1.85	n.d.	4.60	4.78	4.48	3.30
6	2.60	2.48	2.95	4.85	5.70	5.70	5.70	4.78
$\bar{x}$	2.22	2.21	3.11	(4.85)	5.13	5.14	4.81	3.97
s	1.18	1.27	0.75	-	0.46	0.34	0.61	0.67

Tabelle 6.9 L3-2S (Hvh-1)

a) NMRI-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.70	2.60	2.48	n.d.	5.64	5.74	5.88	5.18
2	2.15	2.28	2.11	2.90	4.42	4.20	4.43	3.70
$\bar{x}$	2.43	2.44	2.30	(2.90)	5.03	4.97	5.16	4.44
s	0.39	0.23	0.26	-	0.86	1.09	1.03	1.05

b) C57-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.15	3.04	3.08	n.d.	3.48	4.48	3.00	3.00
2	2.78	2.30	2.30	n.d.	5.00	4.60	4.04	n.d.
3	2.00	2.70	2.85	3.78	4.85	4.95	5.08	4.00
$\bar{x}$	2.64	2.68	2.74	(3.78)	4.43	4.68	4.04	3.50
s	0.59	0.37	0.40	-	0.84	0.24	1.04	0.71

Tabelle 6.10 IES (Hvh-1)

a) NMRI-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	3.42	3.43	3.26	3.28	3.90	4.18	3.90	3.00
2	2.90	3.36	2.90	n.d.	3.85	4.48	4.60	n.d.
3	2.30	2.00	2.00	n.d.	4.85	4.30	4.48	3.30
4	2.04	1.95	2.20	n.d.	5.76	5.86	5.90	5.88
5	n.d.	1.78	1.48	2.78	3.46	4.28	4.57	3.40
$\bar{x}$	2.13	2.50	2.37	3.03	4.36	4.62	4.69	3.90
s	1.31	0.82	0.71	0.35	0.93	0.70	0.73	1.33

b) C57-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	2.95	2.85	n.d.	4.95	5.08	5.20	4.48
2	2.85	2.95	3.18	n.d.	4.15	4.42	3.85	3.48
3	2.95	1.95	3.45	n.d.	4.11	4.45	4.60	3.30
4	1.60	2.34	2.18	n.d.	4.78	4.78	4.70	3.30
5	2.48	1.95	1.95	2.60	4.48	4.70	4.70	4.00
$\bar{x}$	2.44	2.43	2.72	(2.60)	4.49	4.69	4.46	3.71
s	0.54	0.50	0.64	-	0.37	0.27	0.41	0.52

Tabelle 6.11 ER (intermediär)

a) NMRI-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.30	1.90	2.78	n.d.	3.78	4.38	4.30	4.18
2	2.90	2.78	3.20	n.d.	4.04	5.60	5.70	5.00
3	2.60	2.48	2.60	2.85	4.04	4.30	3.90	3.30
$\bar{x}$	2.60	2.39	2.86	(2.85)	3.95	4.76	4.63	4.16
s	0.30	0.45	0.31	-	0.15	0.73	0.95	0.85

b) C57-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.78	3.11	n.d.	3.60	4.15	3.30	3.00
2	2.30	1.95	2.90	n.d.	n.d.	3.48	4.18	3.00
3	n.d.	2.78	2.51	n.d.	3.38	3.38	3.30	3.18
4	2.78	2.85	2.78	3.30	3.85	4.48	4.20	4.18
$\bar{x}$	2.52	2.59	2.83	(3.30)	3.61	3.87	3.75	3.34
s	0.24	0.43	0.25	-	0.24	0.53	0.51	0.57

Tabelle 6.12 D-316 (Hvh-2)

a) NMRI-Fibrblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.00	2.04	2.00	n.d.	4.00	4.11	3.48	3.26
2	2.60	1.95	3.15	n.d.	4.85	4.85	5.18	4.70
3	2.90	2.00	3.04	3.48	4.00	3.70	3.30	2.00
$\bar{x}$	2.50	2.00	2.73	(3.48)	4.28	4.22	3.99	3.32
s	0.46	0.05	0.63	-	0.49	0.58	1.04	1.35

b) C57-Fibrblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.48	2.00	2.70	n.d.	4.78	3.30	3.30	n.d.
2	2.00	1.90	1.90	n.d.	3.78	3.90	3.78	3.48
3	1.90	2.30	1.95	n.d.	3.48	4.18	3.85	2.90
4	2.48	2.48	1.90	n.d.	3.30	4.36	2.90	3.48
5	2.08	1.70	2.00	n.d.	2.48	3.95	2.90	2.00
6	3.30	3.28	3.48	3.30	4.30	4.70	3.48	3.00
$\bar{x}$	2.37	2.28	2.32	(3.30)	3.69	4.07	3.37	2.97
s	0.52	0.57	0.65	-	0.80	0.48	0.41	0.61

Tabelle 6.13 DD (Hvh-2)

a) NMRI-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.00	2.48	2.30	n.d.	4.38	3.60	3.60	3.60
2	2.00	2.48	2.30	n.d.	4.85	4.95	5.18	5.15
3	2.15	2.23	2.51	2.85	4.36	3.70	3.60	3.00
$\bar{x}$	2.05	2.40	2.37	(2.85)	4.53	4.08	4.13	3.92
s	0.09	0.14	0.12	-	0.28	0.75	0.91	1.11

b) C57-Fibroblasten

Nr.	3	5	8	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	2.85	2.00	2.30	n.d.	4.11	4.00	3.95	n.d.
2	2.00	2.00	1.90	n.d.	2.70	3.30	3.90	n.d.
3	1.70	1.60	1.30	n.d.	2.78	2.48	2.85	3.00
4	2.85	2.48	2.30	3.30	4.43	5.08	4.48	3.78
$\bar{x}$	2.35	2.02	1.95	(3.30)	3.51	3.72	3.80	3.39
s	0.59	0.36	0.47	-	0.89	1.10	0.68	0.55

Tabelle 6.14: Titerreduktion im Überstand einer Virussuspension bei Inkubation bei 37°C

a) Lenette (Hvh-1)

Nr.	0	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	5.48	n.d.	5.00	4.48	4.20	3.48
2	4.60	4.48	4.18	n.d.	3.48	3.00
3	5.00	4.85	4.60	n.d.	3.78	3.00
$\bar{x}$	5.03	4.67	4.59	(4.48)	3.82	3.16
s	0.44	0.26	0.41	-	0.36	0.28

b) D-316 (Hvh-2)

Nr.	0	12	24	32	48	72 h.p.i.
1	5.85	5.60	4.65	4.30	4.00	3.00
2	5.54	5.23	n.d.	4.52	3.00	2.70
3	4.95	3.78	3.00	2.78	2.60	2.00
$\bar{x}$	5.54	4.87	3.83	3.87	3.20	2.57
s	0.46	0.96	1.17	0.95	0.72	0.51

• p. i.		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	n
		Mortalität											
o		0	1	5	10	10	11	12	12	12	12	12	56
M 3 h		0	13	16	20	21	21	23	23	23	23	23	57
M 72 h		0	0	1	1	1	2	3	4	4	4	4	53
M 3 h, maxim. Differenz (5. Tag) $p < 0,01$		nach χ^2 -Test (207)											
M 72 h, maxim. Differenz (7. Tag) $p < 0,025$													

• p. i.		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Morbidity										
o abs.		-	37/55	34/51	31/46	31/46	32/45	31/44	31/44	31/44	30/44	30/44
%		-	27,3	66,7	67,4	67,4	71,1	70,5	70,5	70,5	68,2	68,2
M 3 h abs.		-	33/44	36/41	34/37	33/36	30/34	30/34	30/34	30/34	30/34	29/34
%		-	70,5	87,8	91,9	91,7	88,2	88,2	88,2	88,2	88,2	85,3
M 72 h abs.		-	29/53	28/52	28/52	29/52	28/51	29/50	29/49	29/49	29/49	28/49
%		-	54,7	53,8	53,8	55,8	54,9	58,0	59,2	59,2	59,2	57,1

Tabelle 6.16:

Der Einfluß von TM auf die Infektion mit D-316 (Hvh-2)

Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei Parallelversuchen, Infektionsdosis 2×10^3 pfu/Tier

Mortalität

d. p. i.	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	n
Co	0	0	0	3	10	19	31	33	34	36	38	39	39	40	40	41	41	55
TM 3 h	0	0	0	1	3	4	9	12	13	17	17	20	20	26	26	26	26	56
TM 72 h	0	1	4	15	23	32	37	38	42	44	46	47	50	50	50	50	50	56

TM 3 h, maxim. Differenz (10. Tag) $p < 0,001$ TM 72 h, maxim. Differenz (17. Tag) $p < 0,05$
nach χ^2 -Test (207)

Morbidity

d. p. i.	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	n
Co abs.	-	-	14/52	17/45	21/36	15/24	9/22	8/21	7/19	5/17	4/16	4/16	3/16	3/15	3/15	2/14	2/14	190
%	-	-	16,9	37,8	58,3	62,5	40,9	38,1	36,8	29,4	25,0	25,0	18,8	20,0	20,0	14,3	14,3	1
TM 3 h abs.	-	6/56	11/55	13/53	19/52	14/47	16/44	17/43	14/39	11/39	10/36	8/36	2/30	0/30	0/30	0/30	0/30	1
%	-	10,7	20,0	24,5	36,5	29,8	36,4	39,5	35,9	28,2	27,8	22,2	6,7	0	0	0	0	1
TM 72 h abs.	-	5/55	12/52	20/41	17/33	16/24	9/19	11/18	8/14	5/12	4/10	4/9	2/6	1/6	0/6	0/6	0/6	1
%	-	9,1	23,1	48,8	51,5	66,7	47,4	61,1	57,1	41,7	40,0	44,4	33,3	16,7	16,7	0	0	1

Zu Tabelle 6.17 und 6.18: Angaben der Einzelwerte als $-\log$ der höchsten noch viruspositiven Verdünnungsstufe, Inf.Dos. in pfu/Tier

Tabelle 6.17 Virusgehalt in den Organen von NMRI-Mäusen unter dem Einfluß des TM
Lennette (Hvh-1)

a) Leber

Vs. Nr.	Inf. Dos.	1	2	3	4	5	6 d.p.i.
Kontrolle							
1	5.3×10^5	3	-	-	-	-	-
2	3.0×10^4	2	-	-	-	-	-
TM 3 h a.i.							
1	5.3×10^5	5	3	-	-	-	-
2	3.0×10^4	5	4	3	-	-	-
TM 72 h a.i.							
1	5.3×10^5	3	-	-	-	-	-
2	3.0×10^4	-	2	-	-	-	-

b) Milz

Vs. Nr.	Inf. Dos.	1	2	3	4	5	6 d.p.i.
Kontrolle							
1	5.3×10^5	4	3	2	-	-	n.d.
2	3.0×10^4	3	n.d.	2	-	-	n.d.
TM 3 h a.i.							
1	5.3×10^5	5	3	4	-	-	n.d.
2	3.0×10^4	5	4	-	3	-	n.d.
TM 72 h a.i.							
1	5.3×10^5	2	-	3	-	-	n.d.
2	3.0×10^4	2	2	-	-	-	n.d.

Tabelle 6.17 - Fortsetzung

c) Rückenmark

Vs.Nr.	Inf.Dos.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	d.p.i.
--------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	----	--------

Kontrolle

1	5.3×10^5	n.d.	3	4	3	2	-	-	2	-
2	3.0×10^4	1	-	-	5	3	3	1	4	-

TM 3 h a.i.

1	5.3×10^5	n.d.	2	5	5	4	3	3	3	2
2	3.0×10^4	-	3	5	5	4	2	2	2	2

TM 72 h a.i.

1	5.3×10^5	n.d.	-	2	-	-	2	-	-	-
2	3.0×10^4	-	-	1	-	-	-	-	-	-

d) Gehirn

Vs.Nr.	Inf.Dos.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	d.p.i.
--------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	----	--------

Kontrolle

1	5.3×10^5	n.d.	-	3	4	-	-	-	3	-
2	3.0×10^4	-	-	-	3	3	-	-	-	-

TM 3 h a.i.

1	5.3×10^5	n.d.	-	3	5	5	3	-	1	-
2	3.0×10^4	-	-	-	3	5	-	-	-	-

TM 72 h a.i.

1	5.3×10^5	n.d.	-	-	-	-	-	-	4	-
2	3.0×10^4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

e) Thymus

Vs.-Nr. Inf.Dos. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 d.p.i.

Kontrolle

[illegible]

TM 3 h a.i.

1	5.3×10^5	2	-	-	-	-	-	-	n.d.
2	3.0×10^4	3	-	-	-	-	-	2 4	n.d.

TM 72 h a.i.

5.3×10^5 — — — — — n.d.

Tabelle 6.18 Virusgehalt in den Organen von NMRI-Mäusen unter dem Einfluß des TM
D-316 (Hvh-2)

a) Leber

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	d.p.i.
Kontrolle								
1	2.0×10^3	-	-	-	-	-	n.d.	
2	2.0×10^4	-	2	-	-	-	n.d.	
3	5.0×10^5	4	3	3	4	-	n.d.	
TM 3 h a.i.								
1	2.0×10^3	-	-	-	-	-	n.d.	
2	2.0×10^4	-	-	2	-	-	n.d.	
TM 72 h a.i.								
1	2.0×10^3	-	-	-	-	-	n.d.	
2	2.0×10^4	2	-	-	2	2	n.d.	
3	5.0×10^5	3	-	5	-	4	n.d.	

b) Milz

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	d.p.i.
Kontrolle							
1	2.0×10^3	-	2	-	3	-	
2	2.0×10^4	-	3	2	-	-	
3	5.0×10^5	3	2	3	2	-	
TM 3 h a.i.							
1	2.0×10^3	-	3	-	2	-	
2	2.0×10^4	-	3	3	3	2	
TM 72 h a.i.							
1	2.0×10^3	2	-	-	-	-	
2	2.0×10^4	2	-	2	2	2	
3	5.0×10^5	3	3	5	3	3	

Tabelle 6.18 - Fortsetzung

c) Rückenmark

Vs.Nr.	Inf.Dos.	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	d.p.i.
Kontrolle												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	-	2	3	4	1	-	-	
2	2.0×10^4	-	-	1	3	2	4	4	3	1	n.d.	
TM 3 h a.i.												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	-	-	2	-	4	-	1	
2	2.0×10^4	-	-	2	2	2	-	1	-	-	n.d.	
TM 72 h a.i.												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	-	2	5	5	2	4	1	
2	2.0×10^4	-	-	-	2	4	4	4	2	1	n.d.	

d) Gehirn

Vs.Nr.	Inf.Dos.	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	d.p.i.
Kontrolle												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	-	n.d.	5	4	-	-	-	
2	2.0×10^4	-	-	-	1	4	3	3	4	-	n.d.	
TM 3 h a.i.												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	-	-	-	n.d.	2	-	-	
2	2.0×10^4	-	-	-	-	-	-	1	-	-	n.d.	
TM 72 h a.i.												
1	2.0×10^3	n.d.	-	-	1	5	3	5	2	4	-	
2	2.0×10^4	-	-	1	-	4	3	5	4	-	n.d.	

e) Thymus

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	d.p.i.
Kontrolle													
1	2.0×10^3	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	
2	2.0×10^4	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	
TM 3 h a.i.													
1	2.0×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	2.0×10^4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TM 72 h a.i.													
1	2.0×10^3	-	-	n.d.	-	-	1	-	2	2	-	-	

Tabelle 6.19: Bestimmung der ID 50 bei i.p. Inokulation des Stammes Lennette (Hvh-1) in NMRI- und C57-Mäusen
Ausgangstitier 3×10^6 pfu/0,2 ml
Mortalitäts- und Morbiditätsraten in den einzelnen Verdünnungsstufen.

	NMRI			C57	
	tot	max. krank		tot	max. krank
10^0	3/5	4/5	90,9 %*	1/5	1/5
10^{-1}	0/5	4/5	77,8 %	0/5	0/5
10^{-2}	0/5	2/5	37,5 %	0/5	0/5
10^{-3}	0/5	1/5	10,0 %	0/5	0/5
10^{-4}	0/5	0/5	0,0 %	0/5	0/5

* Die Prozentangaben beziehen sich auf kumulierte Häufigkeiten nach Reed & Muench (69).

Tabelle 6.20: Bestimmung der LD 50 bei i.p. Inokulation des Stammes D-316 (Hvh-2) in NMRI- und C57-Mäusen
Ausgangstitier 4.3×10^5 pfu/0,2 ml
Mortalitäts- und Morbiditätsraten in den einzelnen Verdünnungsstufen.

	NMRI			C57	
	tot	max. krank		tot	max. krank
10^0	4/5	4/5	94,1 %*	1/5	1/5
10^{-1}	5/5	5/5	92,3 %	0/5	0/5
10^{-2}	4/5	2/3	77,8 %	0/5	0/5
10^{-3}	3/5	1/2	42,9 %	0/5	0/5
10^{-4}	0/5	0/5	0,0 %	1/5 ^x	0/4

* Die Prozentangaben beziehen sich auf kumulierte Häufigkeiten nach Reed & Muench (69).

^x atypische Krankheitserscheinungen, interkurrente Infektion wahrscheinlich.

Tabelle 6.21 Lennette, 1×10^5 pfu/0,2 ml; 0,1 ml/Tier = 5×10^5 pfu/Tier

Mortalität

Morbidity	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
-----------	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----

NMRAI Mort	0	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
Vi-Ko Morb abs	4/10	8/9	7/8	6/8	6/8	6/8	5/7	5/7	5/7	5/7	5/7	3/7	3/7
Morb %	40	89	88	75	75	75	71	72	72	72	71	43	43
													von 10 Tieren

57 Mort	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i-Ko Morb abs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morb %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
													von 10 Tieren

57 Mort	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i+DS Morb abs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
													von 10 Tieren

Tabelle 6.23: Bestimmung der LD 50 bei intracerebraler Infektion mit dem Stamm Lenette (Hvh-1) in NMRI- und C57-Mäusen
KaNn: Ausgangstiter in Kaninchennierenzellen in pfu/0,2 ml
Mortalitätsraten in den einzelnen Verdünnungsstufen bei 2 Parallelversuchen

Vers.Nr.	NMRI		C57	
	1	2	1	2
KaNn	2.2×10^5	1×10^5	2.2×10^5	1×10^5
10^{-1}	n.d.	5/5	n.d.	5/5
10^{-2}	5/5	5/5	4/4	5/5
10^{-3}	5/5	5/5	5/5	5/5
10^{-4}	5/5	4/6	4/5	5/5
10^{-5}	3/5	1/5	1/3	0/5
10^{-6}	0/5	n.d.	1/4	n.d.

Tabelle 6.24: Bestimmung der LD 50 bei intracerebraler Infektion mit dem Stamm D-316 (Hvh-2) in NMRI und C57-Mäusen
KaNn: Ausgangstiter in Kaninchennierenzellen in pfu/0,2 ml
Mortalitätsraten in den einzelnen Verdünnungsstufen bei 3 Parallelversuchen

Vers.Nr.	NMRI			C57		
	1	2	3	1	2	3
KaNn	1×10^5	5×10^4	1×10^5	1×10^5	5×10^4	1×10^5
10^{-1}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10^{-2}	5/5	n.d.	5/5	5/5	n.d.	5/5
10^{-3}	5/5	5/5	5/5	2/5	3/5	4/5
10^{-4}	4/5	3/4	5/5	0/5	0/5	0/5
10^{-5}	3/5	0/5	2/5	0/5	0/5	1/4
10^{-6}	1/5	1/5	1/5	0/5	1/4	0/5
10^{-7}	n.d.	0/5	n.d.	n.d.	0/5	n.d.

Zu Tabelle 6.25 und 6.26: Angaben der Einzelwerte als -log der höchsten noch viruspositiven Verdünnungsstufe, Inf.Dos. in pfu/Tier

Tabelle 6.25 Virusgehalt in den Organen von NMRI- und C57-bl-Mäusen nach Infektion mit Lennette (Hvh-1)

a) Leber

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	d.p.i
NMRI								
1	1.0×10^6	3	3	3	-	-	-	
2	2.0×10^6	4	4	4	4	4	2	
C57bl								
1	1.0×10^6	3	-	-	-	-	-	
2	2.0×10^6	4	3	2	2	-	-	

b) Milz

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	d.p.i
NMRI								
1	1.0×10^6	3	3	3	-	-	-	
2	2.0×10^6	4	3	2	-	-	-	
C57bl								
1	1.0×10^6	3	-	-	-	-	-	
2	2.0×10^6	4	4	3	-	-	-	

c) Rückenmark

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	7	8	d.p.i
NMRI										
1	1.0×10^6	-	-	2	3	3	3	-	-	
2	2.0×10^6	-	3	3	4	4	4	2	3	
C57bl										
1	1.0×10^6	-	-	3	2	-	2	-	-	
2	2.0×10^6	-	-	3	3	3	2	-	-	

Tabelle 6.25 - Fortsetzung

d) Thymus

Vs-Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	d.p.i.
NMRI											
1	1.0×10^6	3	-	-	2	-	-	-	-	-	
2	2.0×10^6	2	3	3	-	-	-	-	-	-	
C57b1											
1	1.0×10^6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	2.0×10^6	2	1	3	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 6.26 Virusgehalt in den Organen von NMRI und C57b1-Mäusen nach Infektion mit D-316 (Hvh-2)

a) Leber

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	d.p.i.
NMRI								
1	3.0×10^5	1	-	-	1	-	-	
2	1.5×10^6	-	-	2	2	-	-	
3	1.5×10^6	4	3	3	-	-	-	
4	1.0×10^5	3	2	-	-	-	-	
C57b1								
1	3.0×10^5	-	-	-	-	-	-	
2	1.5×10^6	3	2	3	3	-	2	
3	1.5×10^6	4	3	-	2	2	-	
4	1.0×10^5	2	-	-	-	-	-	

b) Milz

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	d.p.i.
NMRI								
1	3.0×10^5	2	-	-	1	1	-	
2	1.5×10^6	3	-	3	-	-	-	
3	1.5×10^6	4	3	3	3	-	-	
4	1.0×10^5	3	-	3	-	-	-	
C57b1								
1	3.0×10^5	-	-	-	-	-	-	
2	1.5×10^6	3	3	3	1	3	-	
3	1.5×10^6	3	2	3	3	-	-	
4	1.0×10^5	2	-	-	-	-	-	

c) Rückenmark

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	d.p.i.
NMRI													
1	1.5×10^6	-	-	1	2	4	4	4	4	n.d.	n.d.	n.d.	
2	1.0×10^5	-	-	-	-	1	3	4	4	3	4	-	
C57b1													
1	1.5×10^6	-	-	-	-	4	1	2	-	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabelle 6.26 - Fortsetzung

d) Thymus

Vs.Nr.	Inf.Dos.	1	2	3	4	5	6	7	8	d.p.i.
--------	----------	---	---	---	---	---	---	---	---	--------

NMRI

1	3.0×10^5	-	-	-	-	-	-	1	n.d.
2	1.5×10^6	-	-	-	-	-	2	-	n.d.
3	1.5×10^6	2	-	-	-	-	2	2	
4	1.0×10^5	-	-	-	-	-	-	3	

C57b1

1	3.0×10^5	-	-	-	-	-	-	n.d.
2	1.5×10^6	1	-	-	-	-	-	n.d.
3	1.5×10^6	2	-	-	-	-	-	-
4	1.0×10^5	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 6.28 D-316, positive Thymusbefunde

a) NMRI-Kontrolle

Vs.Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 d.p.
1	0	0	0	0	0	+	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	+	+	+	+	+	0	+	0	n.d.	n.d.	n.d.
3	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0
5	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0
6	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
-Einzelvers:	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	2/8	3/8	5/7	2/6	0/6	0/6
rel. Häufig.:	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.25	0.38	0.71	0.33	0	0

b) NMRI + TM 72 h a.i.

Vs.Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 d.p.
1	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
3	0	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0
4	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	0
5	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	0
-Einzelvers:	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	2/5	4/5	3/5	0/5	0/5
rel. Häufig.:	0	0.2	0.2	0.2	0	0	0.4	0.8	0.6	0	0

c) NMRI + TM 3 h a.i.

[illegible]

d) C57

[illegible]

7. Verzeichnis der zitierten Quellen

1) Andervont, H.B.:

Activity of herpetic virus in mice

Journal of Infectious Diseases 44, 1929, 383

2) Allison, A.C.:

Genetic factors in resistance against virus infections

Archiv für die gesamte Virusforschung 17, 1965, 280

3) Allison, A.C.:

Virus-associated immunopathology, animal models and implications for human disease

2. cell-mediated immunity, autoimmune diseases, genetics and implications for clinical research

Bulletin of the World Health Organization 1972, 265

4) Allison, A.C., J.S. Harrington, M. Birbeck:

Cytotoxic effects of silica on macrophages

Journal of Experimental Medicine 124, 1966, 153

5) Allison, A.C.:

On the role of macrophages in some pathological processes

aus: Van Furth, R., ed.: Mononuclear Phagocytes

Oxford 1970, 422

6) Allison, A.C.:

Interactions of antibodies, complement components and various cell types in immunity against viruses and pyogenic bacteria

Transplant Review 19, 1974, 3

7) Argyris, B.F.:

Role of macrophages in immunological maturation

Journal of Experimental Medicine 128, 1968, 459

8) Aurelian, L., B. Roizman:

The host range of herpes simplex virus. Interferon, viral DNA, and antigen synthesis in abortive infection of dog kidney cells

Virology 22, 1964, 452

- 9) Babiuk, L.A., S.D. Acres, B.T. Rouse:
Immune interferon production by lymphoid cells: role in
the inhibition of herpesviruses
Interfection and Immunity 13, 1976, 1567
- 10) Baldwin, F.:
Origin of brain macrophages - a new experimental model
Proceedings of the Anatomical Society of Australia and
New Zealand 118, 1974, 388
- 11) Bang, F.B., A. Warwick:
Mouse macrophages as host cells for the mouse hepatitis
virus and the genetic basis of their susceptibility
Proceedings of the National Academy of Sciences (Washington)
46, 1960, 1065
- 12) Beswick, T.S.L.:
Experimental herpes simplex infection in the baby mouse
Journal of Pathological Bacteriology 76, 1958, 133
- 13) Bhatt, P.N., R.O. Jacoby:
Genetic resistance to lethal flavivirus encephalitis.
2. Effect of immunosuppression
Journal of Infectious Diseases 134, 1976, 166
- 14) Bianco, C., F.M. Griffin, S.C. Silverstein:
Studies of the macrophage complement receptor. Alteration
of receptor function upon macrophage activation
Journal of Experimental Medicine 141, 1975, 1278
- 15) Black, F.L., J.L. Melnick:
Micro-epidemiology of poliomyelitis and herpes-B infections.
Spread of the viruses in tissue cultures
Journal of Immunology 74, 1955, 236
- 16) Blanden, R.V.:

Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: mousepox. 2. Passive transfer of recovery mechanisms with immune lymphoid cells. 3. Regression of infectious foci
Journal of Experimental Medicine 133, 1971, 1074

- 17) Brier, A.M., C. Wohlenberg, J. Rosenthal, M. Mage, A.L. Notkins:
Inhibition or enhancement of immunological injury of virus-infected cells
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 68, 1971, 3073
- 18) Carrit, B., P. Goldfarb:
A human chromosomal determinant for susceptibility to herpes simplex virus
Nature 264, 1976, 556
- 19) Caspary, L., D. Falke:
Persönliche Kommunikation
- 20) Cohn, Z.A.:
The structure and function of monocytes and macrophages
Advances in Immunology 9, 1968, 163
- 21) Cohn, Z.A., B. Benson:
The differentiation of mononuclear phagocytes: morphology, cytochemistry and biochemistry
Journal of Experimental Medicine 121, 1965, 153
- 22) Cohn, Z.A., B. Benson:
The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. The influence of serum on granule formation, hydrolase production, and pinocytosis
Journal of Experimental Medicine 121, 1965, 835
- 23) Cook, M.L., J.G. Stevens:
Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection
Infection and Immunity 7, 1973, 272

- 24) Craig, C.P., A.J. Nahmias:
Different patterns of neurologic involvement with herpes simplex virus types 2 and 2: Isolation of HSV type 2 from the buffy coat of two adults with meningitis
Journal of Infectious Diseases 127, 1973, 365
- 25) Darnell, M.B., H. Koprowski:
Genetically determined resistance to infection with group B arboviruses. 2. Increased production of interfering particles in cell cultures from resistant mice
Journal of Infectious Diseases 129, 1974, 248
- 26) Diosi, P., P. Arcan, L. Plavosin:
Genetic control of resistance to mouse cytomegalovirus infection
Archiv für die gesamte Virusforschung 44, 1974, 23
- 27) Dobrzynsky, L.:
Pathogenesis of herpetic encephalitis in cortisone-treated mice
Acta Virologica 14, 1970, 377
- 28) Dowdle, W.R., A.J. Nahmias, R.W. Harwell, F.P. Paulus:
Association of antigenic type of herpesvirus hominis with the site of viral recovery
Journal of immunology 99, 1967, 974
- 29) Downey, H.:
The development of histiocytes and macrophages from lymphocytes
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 45, 1955, 499
- 30) Du Buy, H.:
Effect of silica on virus infections in mice and mouse tissue culture
Infection and Immunity 11, 1975, 996
- 31) Edelson, P.J., R. Zwiebel, Z.A. Cohn:
The pinocytotic rate of activated macrophages

Journal of Experimental Medicine 142, 1975, 1150

- 32) Ejercito, P.M., E.D. Kieff, B. Roizman:
Characterization of HSV strains differing in their effects
on social behaviour of infected cells
Journal of General Virology 2, 1968, 357
- 33) Ennis, F.A.:
Host defense mechanisms against HSV. 1. Control of infection
in vitro by sensitized spleen cells and antibody
Infection and Immunity 7, 1973, 898
- 34) Eustatia, J.M., E. Maase, P. van Helden, J. van der Veen:
Viral replication in mouse macrophages
Archiv für die gesamte Virusforschung 39, 1972, 376
- 35) Falke, D.:
Die Epidemiologie des Varizellen-Zoster-Virus und des Herpesvirus hominis.
Immunität und Infektion 2, 1974, 183
- 36) Falke, D.:
Virologie
aus: P. Klein, ed.: Medizinische Mikrobiologie
Berlin 1976
- 37) Falke, D., D. Bitter-Suermann, I. Clauss:
Riesenzellbildung und virusspezifische Antigene bei Herpesvirus hominis: Informationsfluß von der Eltern-DNS
Archiv für die gesamte Virusforschung 27, 1969, 317
- 38) Falke, D., I.E. Richter:
Mikrokinematische Studien über die Entstehung von Riesenzellen durch Herpes-B-Virus in Zellkulturen
Archiv für die gesamte Virusforschung 11, 1961, 73
- 39) Falke, D., W.P. Rowe:
Die Erkrankung der Maus durch das Virus der Stomatitis vesicularis. 1. Die Ausbreitung des Virus in Abhängigkeit vom

Alter der Maus. 2. Die Pathologie der Organläsionen und der Befall des zentralen und peripheren Nervensystems
Archiv für die gesamte Virusforschung 17, 1965, 549

- 40) Figueroa, M.E., W.E. Rawls:
Biological markers for differentiation of herpes-virus strains of oral and genital origin
Journal of General Virology 4, 1969, 259
- 41) Frank, U.:
Der Einfluß von Dextransulfat 500 auf die Pathogenese der Herpeserkrankung bei NMRI-Mäusen
Dissertationsarbeit, Mainz 1978
- 42) Fujita, S., T. Kitamura:
Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia
Acta Neuropathologica Supp. 6, 1975, 291
- 43) Garabedian, G.A., J.T. Syverton:
Studies on HSV. 2. An Affinity in vitro of herpes virus for rabbit microphages and macrophages
Journal of Infectious Diseases 96, 1955, 5
- 44) Glasgow, L.A.:
Transfer of interferon-producing macrophages: new approach to viral chemotherapy
Science 170, 1970, 854
- 45) Glasgow, L.A.:
Cellular immunity in host resistance to viral infections
Archives of Internal Medicine 126, 1970, 125
- 46) Gönzöl, E., E. Jeney, L. Gergely, L. Vaczy:
Die Vermehrung der Viren der Herpesgruppe in humaner, Überlebender Leukozytenkultur
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Orig. 210, 1969, 289

- 47) Goldman, R., A. Raz:
Concanavalin A and the in vitro induction in macrophages
of vacuolation and lysosomal enzyme synthesis
Experimental Cell Research 96, 1975, 393
- 48) Goodman, G.T., H. Koprowski:
Macrophages as a cellular expression of inherited natural
resistance
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA
48, 1962, 160
- 49) Goodman, G.T., H. Koprowski:
Study of the mechanism of innate resistance to virus in-
fection
Journal of Cellular and Comparative Physiology 59, 1962, 333
- 50) Goodman, J.W.:
On the origin of peritoneal fluid cells
Blood 23, 1964, 18
- 51) Goodpasture, E.W.:
The pathways of infection of the CNS in herpetic encephalitis
of rabbits contracted by contact; with a comparative comment
on medullary lesions in a case of human poliomyelitis
American Journal of Pathology 1, 1924, 29
- 52) Gresser, J., D.J. Lang:
Relationships between viruses and macrophages
Progress in Medical Virology 8, 1966, 62
- 53) Gresser, J., M.G. Tovey, C. Maury, M.T. Bandu:
Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in
mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum.
2. Studies with herpes simplex, moloney sarcoma, vesicular
stomatitis, Newcastle disease, and influenza viruses
Journal of Experimental Medicine 144, 1976, 1316
- 54) Grewal, A.S., B.T. Rouse, L.A. Babiuk:
Mechanisms of resistance to herpesviruses: Comparison of the

effectiveness of different cell types in mediating antibody
-dependent cell-mediated cytotoxicity
Infection and Immunity 15, 1977, 698

- 55) Gröschel, O., H. Koprowski:
Development of a virus-resistant inbred mouse strain for
the study of innate resistance to arbo-B-viruses
Archiv für die gesamte Virusforschung 18, 1965, 379
- 56) Hadden, J.W., J.R. Sadlik, E.M. Hadden:
Macrophage proliferation induced in vitro by a lymphocyte
factor
Nature 257, 1975, 483
- 57) Haller, O.A.:
Immunmanipulation bei angeborener Resistenz der Maus gegen-
über Myxovirusinfektionen
Pathologia et Microbiologia 41, 1974, 135
- 58) Haller, O.A., H. Arnheiter, J. Lindenmann:
genetically determined resistance to infection by hepato-
tropic influenza A virus in mice: Effect of immunosuppression
Infection and Immunity 13, 1976, 844
- 59) Hanson, B., H. Koprowski, S. Baron, C.E. Buckler:
Interferon-mediated natural resistance of mice to arbo-B-
virus infection
Microbios 18- 1969, 51
- 60) Higgins, D.A., B.W. Calnek:
Some effects of silica treatment on Marek's disease
Infection and Immunity 13, 1976, 1054
- 61) Hill, T.J., H.J. Field, W.A. Blyth:
Acute and recurrent infection with HSV in the mouse: a model
for studying latency and recurrent disease
Journal of General Virology 28, 1975, 341

- 62) Hirsch, J.E., M.E. Fedorko:
Morphology of mouse mononuclear phagocytes
Oxford 1970, 10
- 63) Hirsch, M.S., B. Zisman, A.C. Allison:
Macrophages and age-dependent resistance to HSV in mice
Journal of Immunology 104, 1970, 1160
- 64) Hough, V., T.W.E. Robinson:
Exacerbation and reactivation of herpesvirus hominis infection in mice by cyclophosphamide
Archives of Virology 48, 1975, 75
- 65) Hutton, R.D., D.L. Ewert, G.R. French, A.J. Nahmias:
Differentiation of types 1 and 2 HSV by plaque inhibition with sulfated polyanions
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 142, 1973, 27
- 66) Ito, M., A.L. Barron:
Surface antigen produced by HSV
Journal of Immunology 108, 1972, 711
- 67) Jacobs, R.P., L. Aurelian, G.A. Cole:
Cell-mediated immune response in lymph nodes draining the site of primary infection
Journal of Immunology 117, 1976, 1004
- 68) Jacoby, R.D., P.N. Bhatt:
Genetic resistance to lethal flavivirus encephalitis.
1. Infection of congenic mice with Banzi virus
Journal of Infectious Diseases 134, 1976, 158
- 69) Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg:
Medizinische Mikrobiologie 3. Aufl.
Berlin 1973
- 70) Johnson, R.T.:
The pathogenesis of herpes virus encephalitis.

1. Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody staining
Journal of Experimental Medicine 119, 1964, 343
2. A cellular basis for the development of resistance with age
Journal of Experimental Medicine 120, 1964, 359
- 71) Johnson, R.T., C.A. Mims:
Pathogenesis of viral infections of the nervous system
New England Journal of Medicine 278, 1968, 23
- 72) Kantoch, M., F.B. Bang:
Conversion of genetic resistance of mammalian cells to susceptibility to a virus infection.
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 48, 1962, 1553
- 73) Kantoch, M., A. Warwick, F.B. Bang:
The cellular nature of genetic susceptibility to a virus
Journal of Experimental Medicine 117, 1963, 781
- 74) Karnovsky, M.L., L. Simmins, E.A. Glass, A.W. Shafer, P. d'Arcy Hart:
Metabolism of macrophages. Kap. 7 aus: van Furth, ed.:
Mononuclear phagocytes
Oxford 1970
- 75) Kilbourne, E.D., F.L. Horsfall:
Studies of herpes simplex virus in newborn mice
Journal of Immunology 67, 1951, 321
- 76) Kirchner, H., H.M. Hirt, C. Kleinicke, K. Munk:
Replication of herpes simplex virus in mouse spleen cell cultures stimulated by lipopolysaccharide
Journal of Immunology 117, 1976, 1753
- 77) Keller, R., V.E. Jones:
Role of activated macrophages and antibody in inhibition and enhancement of tumor growth in rats

Lancet 2, 1971, 847

- 76) Koszinowsky, U., F. Kruse, R. Thomssen:
Interactions between vaccinia virus and sensitized macrophages in vitro
Archives of Virology 48, 1975, 335
- 79) Lancz, G.J.:
Herpes simplex viruses types 1 and 2. Type and strain specific characteristics affecting virus plaque formation
Archiv für die gesamte Virusforschung 46, 1974, 36
- 80) Larson, C.L., R.N. Ushijima, R. Karim, M.B. Baker, R.E. Baker:
Herpes virus hominis type 2 infections in rabbits: Effect of prior immunization with attenuated mycobacterium bovis (BCG) cells
Infection and Immunity 6, 1972, 465
- 81) Lerner, A.M., E.J. Bailey:
Differential sensitivity of herpes simplex virus types 1 and 2 to human interferon: Antiviral effects of interferon plus 9-beta-D-arabinofuranosyladenine
The Journal of Infectious Diseases 134, 1976, 400
- 82) Liebhaver, H., K.K. Takemoto:
Alteration of plaque morphology of encephalomyocarditis virus with polyanions
Virology 14, 1961, 502
- 83) Lin, H.S.:
Peritoneal exudate cells. 2. Kinetics of appearance of colony-forming cells
Journal of Cellular Physiology 84, 1974, 159
- 84) Lindenmann, J.:
Inheritance of resistance to influenza virus in mice
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 116, 1964, 506

- 85) Lindenmann, J., C. Lane, D. Hobson:
The resistance of A2G mice to myxoviruses
Journal of Immunology 90, 1963, 942
- 86) Lindermann, J., D. Falke:
persönliche Kommunikation
- 87) Lockart jr. R.Z.:
Interference and interferon with respect to herpes viruses.
Kap. 8 aus: Kaplan, A.S., ed.: The herpesvirus
New York, London 1973, 261
- 88) Lodmell, D.L., A. Niwa, K. Hayashi, A.L. Notkins:
Prevention of cell-to-cell spread of herpes simplex virus
by leukocytes
Journal of Experimental Medicine 137, 1973, 706
- 89) Lodmell, D.L., A.L. Notkins:
Cellular immunity to herpes simplex virus mediated by interferon
Journal of Experimental Medicine 140, 1974, 764
- 90) Longson, M.:
A temperature marker test for the differentiation of strains
of herpesvirus hominis
Annales de l'Institut Pasteur de Lille 120, 1971, 699
- 91) Lopez, C.:
Genetics of natural resistance to herpesvirus infections
in mice
Nature 258, 1975, 152
- 92) Lowry, S.P., J.L. Melnick, W.E. Rawls:
Investigation of plaque formation in chick embryo cells as
a biological marker for distinguishing herpes virus type 2
from type 1
Journal of General Virology 10, 1971, 1
- 93) Lutton, J.D., L. Kiremidjian:

Electrokinetic studies on normal and thioglycollate stimulated peritoneal macrophages

Experimental Cell Research 79, 1973, 492

94) Mackaness, G.B.:

The immunological basis of acquired cellular resistance

Journal of Experimental Medicine 120, 1964, 105

95) Mackaness, G.B.:

Cellular immunity, aus: van Furth, ed.: Mononuclear phagocytes, Kap. 28

Oxford 1970, 461

96) MacKay Murray, I.:

The mechanism of blockade of the reticuloendothelial system

Journal of Experimental Medicine 117, 1963, 139

97) Merigan, T.C.:

Host defenses against viral disease

New England Journal of Medicine 290, 1974, 323

98) Mims, C.A.:

Aspects of the pathogenesis of virus diseases

Bacteriological Reviews 28, 1964, 30

99) Mogensen, S.C.:

Biological conditions influencing the focal necrotic hepatitis test for differentiation between HSV types 1 and 2

Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia Sect. B

84, 1976, 154

100) Mogensen, S.C.:

Role of macrophages in hepatitis induced by HSV types 1 and 2 in mice

Infection and Immunity 15, 1977, 686

101) Mogensen, S.C., B. Teisner, H. Kerzel-Andersen:

Focal necrotic hepatitis in mice as a biological marker for differentiation of herpesvirus hominis type 1 and 2

Journal of General Virology 25, 1974, 151

- 102) Morahan, P.S., E.R. Kern, L.A. Glasgow:
Immunomodulator-induced resistance against HSV
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 154, 1977, 615

- 103) Mori, R., T. Tasaki, G. Kimura, K. Takeya:
Depression of acquired resistance against HSV infection
in neonatally thymectomized mice
Archiv für die gesamte Virusforschung 21, 1967, 459

- 104) Munk, K., D. Donner:
Cytopathischer Effekt und Plaque-Morphologie verschiedener
HSV-Stämme
Archiv für die gesamte Virusforschung 13, 1963, 529

- 105) Nahmias, A.J., I. del'Buono, K.E. Schneeweis, D.S. Gordon,
D. Thies:
Type-specific surface antigens of cells infected with HSV
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 138, 1971, 21

- 106) Nahmias, A.J., W.R. Dowdle:
Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis
Progress in Medical Virology 10, 1968, 110

- 107) Nahmias, A.J., M.S. Hirsch, J.H. Kramer, F.A. Murphy:
Effect of antithymocyte serum on herpesvirus hominis
(type 1) infection in adult mice
Proceedings of the Society of Experimental Biology and
Medicine 132, 1969, 696

- 108) Nahmias, A.J., S. Kibrick:
Inhibitory effect of heparin on HSV
Journal of Bacteriology 87, 1964, 1060

- 109) Nahmias, A.J., S. Kibrick, R.C. Rosan:
Viral leucocyte interrelationships. 1. multiplication

of a DNA-virus - herpes simplex - in human leukocyte cultures
Journal of Immunology 93, 1964, 69

- 110) Nahmias, A.J., B. Roizman:
Infection with herpes simplex viruses 1 and 2
New England Journal of Medicine 289, 1973, 667
- 111) Nahmias, A.J., C. Wickliffe, L. Pipkin, A. Leibowitz,
R. Hutton:
Transport media for HSV types 1 and 2
Applied Microbiology 22, 1971, 451
- 112) North, R.J.:
The uptake of particulate antigens
Journal of the Reticuloendothelial Society 5, 1968, 203
- 113) North, R.J.:
Cellular kinetics associated with the development of
acquired cellular resistance
Journal of Experimental Medicine 130, 1969, 299
- 114) Notkins, A.L.:
Commentary. Immune mechanisms by which the spread of viral
infection is stopped
Cellular Immunology 11, 1974, 478
- 115) Notkins, A.L., D.L. Lodmell:
Cellular immune response in viral infections
aus: Perspectives in Virology 4, Antiviral Mechanisms
(M. Pollard ed), New York 1975, 115
- 116) Oakes, J.E.:
Role for cell-mediated immunity in the resistance of
mice to subcutaneous HSV infection
Infection and Immunity 12, 1975, 166
- 117) Olitsky, P.K., R.W. Schlesinger:
Effect of local edema and inflammation in the skin of the
mouse on the progression of herpes virus

Science 93, 1941, 574

- 118) Pearsall, N.N., R.J. Weiser:
The macrophage in allograft immunity. 1. Effects of silica
as a specific macrophage toxin
Journal of the Reticuloendothelial Society 5, 1968, 107 .
- 119) Plummer, G., W.F. Hackett:
Herpes simplex viruses and paralysis of animals
British Journal of Experimental Pathology 47, 1966, 82
- 120) Plummer, G., J.L. Waner, C.P. Bowling:
Comparative studies of type 1 and type 2 herpes simplex
viruses
British Journal of Experimental Pathology 49, 1968, 202
- 121) Plummer, G., J.L. Waner, A. Phuangsab, C.R. Goodheart:
Type 1 and type 2 herpes simplex viruses: serological and
biological differences
Journal of Virology 5, 1970, 51
- 122) Polliack, A., S. Gordon:
Scanning electron microscopy of murine macrophages. Surface
characteristics during maturation, activation, and phago-
cytosis
Laboratory Investigation 33, 1975, 469
- 123) Rager-Zisman, B., A.C. Allison:
The role of antibody and host cells in the resistance of
mice against infection by Coxsackie B-3 virus
Journal of General Virology 1973, 329
- 124) Rager-Zisman, B., A.C. Allison:
Effects of immunosuppression on Coxsackie B-3 virus infection
in mice, and passive protection by circulating antibody
Journal of General Virology 19, 1973, 339
- 125) Rager-Zisman, B., A.C. Allison:
Mechanism of immunologic resistance to HSV-1 infection

Journal of Immunology 116, 1976, 35

- 126) Rajcáni, J., A. Sabo, D. Blascovic:
Vergleichende Untersuchungen zur experimentellen Pathogenese
des HSV bei der Maus. Intracerebrale, intraperitoneale und
orale Infektion der Säuglingsmaus
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions-
krankheiten und Hygiene I. Abt. Orig.211, 1969, 421
- 127) Rajcáni, J., A. Sabo, D. Blascovic:
Vergleichende Untersuchungen zur experimentellen Pathogenese
des HSV bei der Maus. Intraperitoneale Inokulation der ju-
gendlichen Maus
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions-
krankheiten und Hygiene I. Abt. Orig. 215, 1970 1
- 128) Rapp, F.:
Variants of HSV: isolation, characterization, and factors
influencing plaque formation
Journal of Bacteriology 86, 1963, 985
- 129) Rawls, W.E., D. Laurel, J.L. Melnick, J.M. Glicksman,
R.H. Kaufman:
A search for viruses in smegma, premalignant and early malign-
ant cervical tissues. The isolation of herpesviruses with
distinct antigenic properties
American Journal of Epidemiology 87, 1968, 647
- 130) Rebuck, J.W., G.A. Lo Grippo:
Characteristics and interrelationships of the various cells
in the RE cell, macrophage, lymphocyte, and plasmacell
series in man
Laboratory Investigation 10, 1961, 1068
- 131) Rebuck, J.W., F.W. Whitehouse, S.M. Noonan:
Energization of lymphocytes transforming to macrophages
in human inflammation
Biochemical Pharmacology Suppl. 1968, 159

- 132) Renis, H.E., E.E. Eidson, J. Mathews, J.E. Gray:
Pathogenesis of HSV types 1 and 2 in mice after various
routes of inoculation
Infection and Immunity 14, 1976, 571
- 133) Roberts, J.A.:
Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in
cultured macrophages from normal and ectromelia-immune mice
Journal of Immunology 92, 1963, 837
- 134) Roberts, J.A.:
Histopathogenesis of mouse pox. 3. ectromelia virulence
British Journal of Experimental Pathology 44, 1963, 465
- 135) Rodgers, F.G.:
Infection, haemorrhage and death of chick embryos after
inoculation of HSV type 2 on to the chorioallantoic membrane
Journal of General Virology 21, 1973, 187
- 136) Roizman, B.:
Extracellular pH and HSV multiplication
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 119, 1965, 1021
- 137) Ronge, K., D. Falke:
Persönliche Kommunikation
- 138) Rosenberg, G.L., A.L. Notkins:
Induction of cellular immunity to HSV: relationship to
the humoral immune response
Journal of Immunology 112, 1974, 1019
- 139) Rouse, B.T., L.A. Babiuk:
Defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis
virus: inhibition of virus infection by murine macrophages
Infection and Immunity 11, 1975, 505
- 140) Russel, A.S.:
Cell-mediated immunity to HSV in man

Journal of Infectious Diseases 129, 1974, 142

141) Sabin, A.S.:

Genetic, humoral and age factors in natural resistance to certain viruses

Annals of the New York Academy of Sciences 54, 1952, 936

142) Sabin, A.S.:

Nature of inherited resistance to viruses affecting the nervous system

Proceedings of the National Academy of Sciences USA 38, 1952, 540

143) Schauf, V., L. Falk, F. Deinhardt:

Effect of Bacillus Calmette-Guérin immunization in marmosets infected experimentally with herpesvirus saimiri

Journal of the National Cancer Institute 54, 1975, 721

144) Schell, K.:

Studies on the innate resistance of mice to infection with mousepox. 1. Resistance and antibody production

Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 38, 1960, 271

145) Schell, K.:

Studies on the innate resistance of mice to infection with mousepox. 2. Route of inoculation and resistance

Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 38, 1960, 289

146) Schneeweis, K.E.:

Die Typen 1 und 2 des HSV bei verschiedenen Krankheitsbildern
Deutsche Medizinische Wochenschrift 92, 1967, 2313

147) Selgrade, M.K., J.E. Osborn:

Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus
Infection and Immunity 10, 1974, 1383

148) Sethi, K.K., B. Pelster, N. Suzuki, G. Piekarski, H. Brandis:

Immunity to toxoplasma gondii induced in vitro in non-immune mouse macrophages with specifically immune lymphocytes
Journal of Immunology 115, 1975, 1151

- 149) Shore, S.L., C.M. Black, F.M. Melewicz, P.A. Wood, A.J. Nahmias:
Antobody-dependent cell-mediated cytotoxicity to target cells infected with type 1 and type 2 HSV
Journal of Immunology 116, 1976, 194
- 150) Silverstein, S.:
Macrophages and viral immunity
Seminars in Hematology 7, 1970, 185
- 151) Slonecker, C.E.:
The cellular composition of an acute inflammatory exudate in rats
Journal of the Reticuloendothelial Society 10, 1971, 269
- 152) Smith, J.W., J.E. Rodriguez, A.P. Mc Kee:
Biological characteristics of cloned populations of HSV types 1 and 2
Applied Microbiology 21, 1971, 350
- 153) Starr, S.E., S. A. Karatela, S.L. Shore, A. Duffey, A.J. Nahmias:
Stimulation of human lymphocytes by HSV antigens
Infection and Immunity 11, 1975, 109
- 154) Stevens, J.G., M.E. Cook:
Restriction of HSC by macrophages. An analysis of the cell-virus interaction
Journal of Experimental Medicine 133, 1971, 19
- 155) Stewart, C.C., H.S. Lin, C. Adles:
Proliferation and colony-forming ability of peritoneal exudate cells in liquid culture
Journal of Experimental Medicine 141, 1975, 1114

- 156) Strauss, R.R., H. Friedman, L. Mills, G. Zayon:
Suppression of murine virus leukaemogenesis by thioglycollate,
a bacteriological culture medium that affects macrophage
peroxidase
Nature 255, 1975, 343
- 157) Stubbs, M., A. Vreeland-Kühner, E.A. Glass, J.R. David,
M.L. Karnovsky:
Metabolic and functional studies on activated mouse macro-
phages
Journal of Experimental Medicine 137, 1973, 537
- 158) Takemoto, K.K., P. Fabisch:
Inhibition of herpes virus by natural and synthetic poly-
saccharides
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 116, 1964, 140
- 159) Tompkins, W.A.F., J.M. Zarling, W.E. Rawls: .
In vitro assessment of cellular immunity to vaccinia virus:
contribution of lymphocytes and macrophages
Infection and Immunity 2, 1970, 783
- 160) Tosolini, F.A., C.A. Mims:
Effect of murine strain and viral strain on the pathogenesis
of lymphocytic choriomeningitis infection and a study of
footpad responses
Journal of Infectious Diseases 123, 1971, 134
- 161) Turner, G.S., R. Ballard:
Interaction of mouse peritoneal macrophages with fixed
rabies virus in vivo and in vitro
Journal of General Virology 30, 1976, 223
- 162) Tytell, A.A., R.E. Neuman:
A medium free of agar, serum and peptone for plaque assay
of HSV
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 113, 1963, 343

- 163) Unkeless, J.C., S. Gordon, E. Reich:
Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages
Journal of Experimental Medicine 139, 1974, 834
- 164) Vaheri, A., K. Cantell:
The effect of heparin on HSV
Virology 21, 1963, 861
- 165) Vahne, A., J. Blomberg, S. Olofsson, E. Lycke:
Subtyping of HSV
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia Sect. B
83, 1975, 506
- 166) Valle, M.J., A.M. Bobrove, S. Strober, T.C. Merigan:
Immune specific production of interferon by human T-cells
in combined macrophage-lymphocyte cultures in response to
herpes simplex antigen
Journal of Immunology 114, 1975, 435
- 167) Van Furth, R., Z.A. Cohn:
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes
Journal of Experimental Medicine 128, 1968, 415
- 168) Vernon-Roberts, B.:
Lymphocyte to macrophage transformation in the peritoneal
cavity preceding the mobilization of peritoneal macrophages
to inflamed areas
Nature 222, 1969, 1286
- 169) Virelizier, J.L., A.C. Allison:
Correlation of persistent MHV-3 infection with its effect
on mouse macrophage cultures
Archives of Virology 50, 1976, 279
- 170) Volkman, A., J.L. Gowans:
The production of macrophages in the rat
British Journal of Experimental Pathology 46, 1965, 50
- 171) Volkman, A., J.L. Gowans:

The origin of macrophages from bone marrow in the rat
British Journal of Experimental Pathology 46, 1965, 62

172) Volkman, A.:

The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal
exudates in rats

Journal of Experimental Medicine 124, 1966, 241

173) Wachsmuth, E.D.:

Aminopeptidase as a marker for macrophage differentiation
Experimental Cell Research 96, 1975, 409

174) Webster, L.T., M.S. Johnson:

Comparative virulence of St. Louis encephalitis virus cul-
tured with brain tissue from innately resistant and innat-
ely susceptible mice

Journal of Experimental Medicine 74, 1941, 489

175) Weiser, B., Bang, F.B.:

Macrophages genetically resistant to mouse hepatitis virus
converted in vitro to susceptible macrophages

Journal of Experimental Medicine 143, 1976, 690

176) Wildy, P.:

The progression of HSV to the central nervous system of
the mouse

Journal of Hygiene 65, 1967, 173

177) Wilton, M.A., L. Ivany, T. Lehner:

Cell-mediated immunity in herpesvirus hominis infections
British Medical Journal 1, 1972, 723

178) Yamamoto, T., S. Otani, H. Shiraki:

A study of the evolution of viral infection in experimental
herpes simplex encephalitis and rabies by means of fluores-
cent antibodies

Acta Neuropathologica 5, 1965, 288

179) Zisman, B., M.S. Hirsch, A.C. Allison:

Selective effects of anti-macrophage serum, silica, and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of herpes virus infection of young adult mice
Journal of Immunology 104, 1970, 1155

- 180) Zisman, B., E.F. Wheelock, A.C. Allison:
Role of macrophages and antibodies in resistance of mice against yellow fever virus
Journal of Immunology 107, 1971, 236
- 181) Unkeless, J.C., H.N. Eisen:
Binding of monomeric immunoglobulins to Fc-receptors of mouse macrophages
Journal of Experimental Medicine 142, 1975, 1520
- 182) Barski, G., G. Messori, P. Lépine:
L'exsudat péritonéal artificiel source de cellules pour la culture des virus in vitro
Annales de l'Institut Pasteur 89, 1955, 366
- 183) Allison, A.C., L. Mallucci:
Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures
Journal of Experimental Medicine 121, 1965, 463
- 184) Nahmias, A.J., C.A. Alford, S.B. Korones:
Infection of the newborn with herpesvirus hominis
Advances in Pediatrics (I. Schulman ed.) 17, 1970, 185
- 185) Rajcáni, J., E. Gajdosova, V. Mayer:
Pathogenesis of herpesvirus hominis infection in immunosuppressed mice
Acta Virologica 18, 1974, 135
- 186) Jamuni, A., M. Holden:
The role of leucocytes in immunity to herpes
Journal of Immunology 26, 1934, 395
- 187) Wagner, W.H.:

Host-parasite interactions with peritoneal macrophages in mice and rats in vitro and in vivo
Infection and Immunity 12, 1975, 1295

188) Fenner, F.:

The biology of animal viruses
Vol. 2, New York 1968

189) Lennette, E.H., H. Koprowski:

Influence of age on the susceptibility of mice to infection with certain neurotropic viruses
Journal of Immunology 49, 1944, 175

190) Falke, D.:

Ca^{++} , Histidin, und Zn^{++} als Faktoren bei der Riesenzellbildung durch das Herpesvirus hominis
Zeitschrift für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie 153, 1967, 175

191) Falke, D.:

Untersuchungen über die Beziehung zwischen Riesenzellbildung und Infektiosität von Herpes simplex Virus
Archiv für die gesamte Virusforschung 15, 1965, 387

192) Kaplan, A.S.:

A study of the HSV - rabbit kidney cell system by the plaque technique
Virology 4, 1957, 453

193) Docherty, J.J., R.J. Goldberg, F. Rapp:

Differential effect of 7,17-Dimethylbenzanthracene on infectivity of HSV type 2
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 136, 1971, 328

194) Dunderoff, S., D. Falke:

Thymidine-, uridine- and cholinekinase in rabbit kidney cells infected with herpesvirus hominis type 1 and 2
Archiv für die gesamte Virusforschung 38, 1972, 56

- 195) Balner, H.:
Identification of peritoneal macrophages in mouse radiation chimeras
Transplantation 1, 1963, 217
- 196) Bittlingmaier, K.:
Die Aufnahme von ^3H -Thymidin und die Zell-DNA-Synthese während der Frühphase der Vermehrung von Hvh in BHK-Zellen
Dissertationsschrift Mainz 1975
- 197) Nahmias, A.J., W.E. Josey, Z.M. Naib:
Neonatal herpes infection - role of genital infection in mother as a source of virus in the newborn
Journal of the American Medical Association 199, 1967, 164
- 198) Kirchner, H., H.M. Hirt, K. Munk:
Protection against herpes simplex infection in mice by corynebacterium parvum
Infection and Immunity 16, 1977, 9
- 199) Lindenmann, J., E. Denel, S. Fanconi, O. Haller:
Inborn resistance of mice to myxoviruses: macrophages express phenotype in vitro
Journal of Experimental Medicine 147, 1978, 531
- 200) Allison, A.C.:
Immunity and immunopathology in virus infections
Annales de l'Institut Pasteur 123, 1972, 585
- 201) Spector, W.G.:
Macrophage turnover and traffic - a review
D. Falke: personal communication
- 202) Hirt, H.M., R. Zawatzky, H. Kirchner:
In vitro production of interferon type 2 as a parameter of immunity to HSV in mice
D. Falke: personal communication
- 203) Sellers, M.J.:

Studies on the entry of viruses into the central nervous system of mice via the circulation

Journal of Experimental Medicine 129, 1969, 719

- 204) Kirchner, H., H.M. Hirt, D.L. Rosenstreich, S.E. Mergenhagen:
Resistance of C3H/HeJ mice to lethal challenge with HSV
Proceedings of the Society for Experimental Biology and
Medicine 157, 1978, 29
- 205) Rajcani, J. P.E. Conen:
Observations on neural spread of HSV in suckling mice:
an electron microscopis study
Acta Virologica 16, 1972, 31
- 206) Oakes, J.E.:
Invasion of the CNS by HSV-1 after subcutaneous inoculation
of immunosuppressed mice
Journal of Infectious Diseases 131, 1975, 51
- 207) Campbell, R.C.:
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Stuttgart 1971
- 208) Clauss, G., H. Ebner:
Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und
Soziologen
Frankfurt am Main und Zürich 1972
- 209) Sethi, K.K., H. Brandis:
In vitro acquisition of resistance against HSV by permissive
murine macrophages
Archives of Virology 59, 1979, 157

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. D. Falke für die freundliche Überlassung des
Themas und seine stetige Hilfe bei der Durchführung der Expe-
rimente,

den Mitarbeitern der Abteilung Virologie für ihre Unterstützung
und nicht zuletzt Herrn M. Speitel für seine tatkräftige Mitar-
beit bei der Herstellung der Graphiken.

8. Lebenslauf

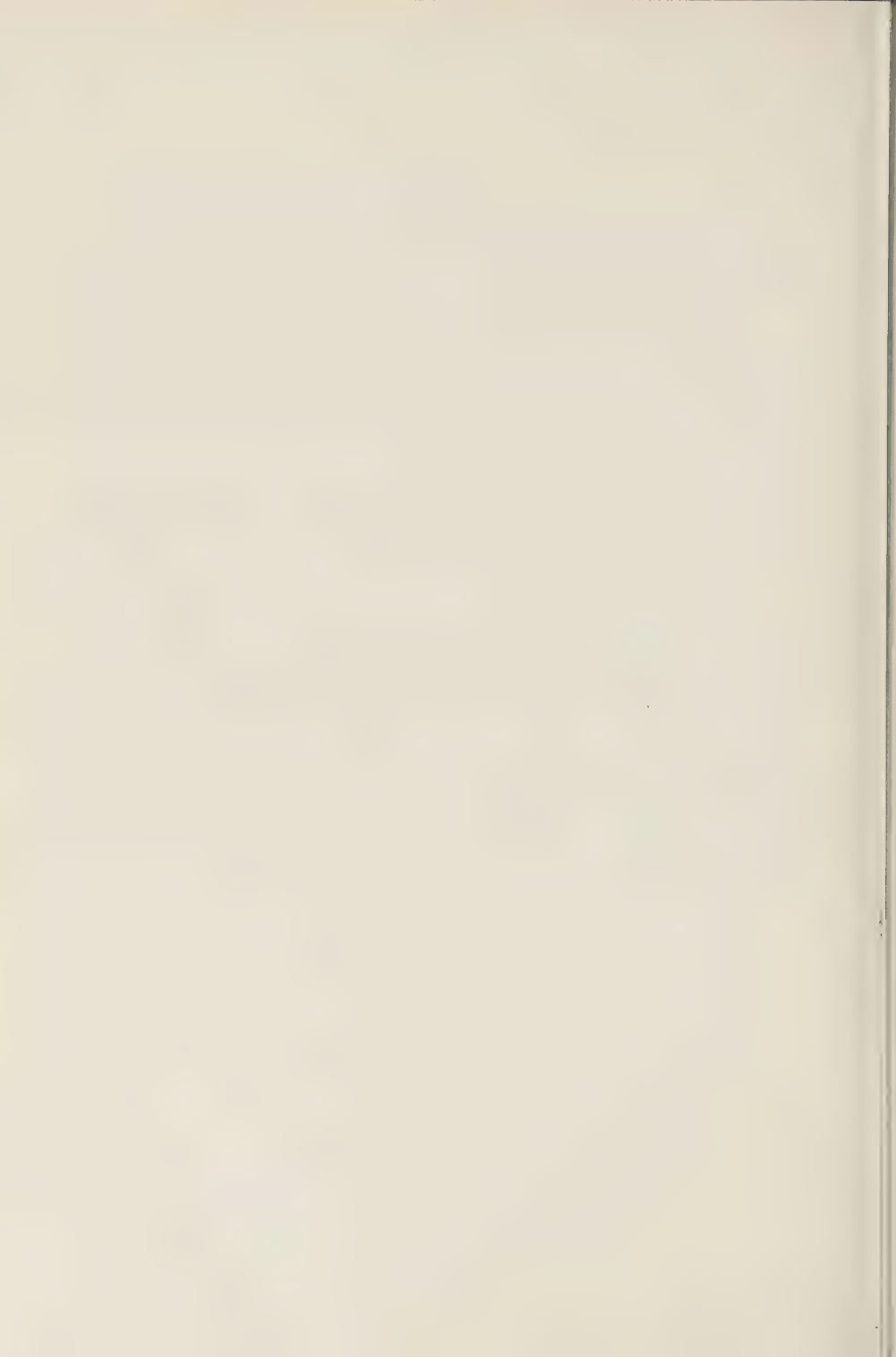
Ich wurde am 19.5.1955 als erste von vier Töchtern des OStR Clemens Schindling und der Apothekerin Ruthild Schindling geb. Streckert in Hofheim am Taunus geboren.

Vom April 1961 bis April 1965 besuchte ich die Grundschule in Hattersheim, von der ich auf das humanistische Gymnasium in Wiesbaden überwechselte, das ich im Juli 1972 mit der Reifeprüfung wieder verließ.

Zum Wintersemester 1972/73 nahm ich das Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz auf. Im August 1974 bestand ich das Physikum, ein Jahr später den ersten Teil und im März 78 den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung.

Zur Zeit leiste ich das praktische Jahr am Akademischen Lehrkrankenhaus Kaiserslautern (Wahlfach Pädiatrie) ab und werde aller Voraussicht nach mein Medizinstudium im Mai 1979 abgeschlossen haben.

Seit April 1973 bin ich Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes.



Druck: Reinartz

Copier- und Offset-Center

Gaustraße 16, Telefon 061 31/9 3670 + Kirschgarten 3, Telefon 061 31/962 02
6500 Mainz

